

Université de Montréal

**Stress périnatal : conséquences sur le comportement
cognitif et émotionnel de la progéniture chez le rat.**

par

Thierno Madjou BAH

Sciences biomédicales

Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en Sciences biomédicales

Option : Sciences psychiatriques

Août, 2005

© Thierno Madjou BAH, 2005



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Stress périnatal : conséquences sur le comportement cognitif et émotionnel de la
progéniture chez le rat

présentée par :

Thierno Madjou BAH

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Graciela Piñeyro, Ph.D., Président-rapporteur

Roger Godbout, Ph.D., Directeur de recherche

Nathalie Le Marec, Ph.D., Co-directeur

Sandra Boye, Ph.D., Membre du jury

Résumé

La période entourant la gestation et les premières semaines de vie de la progéniture est cruciale pour le développement optimal de celle-ci. Cette période correspond à une période où la plasticité cérébrale et le remodelage synaptique sont accrus. Toute activation anormale des systèmes du stress durant la période périnatale peut avoir des effets négatifs sur le comportement. Dans le présent mémoire, nous avons étudié chez le rat les conséquences d'un stress périnatal sur le comportement émotionnel tout en contrôlant les variables contaminantes comme le comportement cognitif et psychomoteur.

Un groupe de six femelles gestantes fut soumis à un stress chronique sous forme d'aboiements canins (stimulation imprévisible, intermittente et variable en intensité) appliqué durant toute la période périnatale. Un autre groupe de quatre femelles témoins fut gardé en conditions standards d'animalerie. Tous les petits furent étudiés de la même façon pour les deux groupes.

Les résultats obtenus montrent que les rats expérimentaux présentent une anxiété de trait et une anxiété d'état transitoire significativement plus élevée que les rats témoins. Ils présentent également un défaut d'habituation à leur environnement en champs ouverts et au labyrinthe en croix surélevé. On note aussi un apprentissage spatial moins bien consolidé à la piscine de Morris. Des déficits dans les tâches faisant appel aux lobes frontaux furent observés se traduisant par un manque de flexibilité cognitive

et/ou de mémoire de travail dans une tâche d'alternance en milieu aquatique alors que les capacités motrices furent préservées.

Ces résultats montrent qu'une stimulation stressante périnatale induit un comportement anxieux chez la progéniture et les tâches reliées au cortex préfrontal semblent particulièrement plus vulnérables à cette stimulation.

Mots-clés : Anxiété, stress périnatal, apprentissage, gestation, rat.

Abstract

Pregnancy and the first weeks of life are crucial for the optimal development of offspring. This period corresponds to maximum changes in plasticity and synaptic organization in the central nervous system. Any abnormal activation of the stress systems during perinatal period can have negative effects on behavior. In the present work we studied the consequences of perinatal stress on the emotional behavior while confoundable variables as psychomotor and cognitive behaviour were studying too on rat offspring.

A group of six pregnant females was subjected to a chronic perinatal stress using dogs' barking (stimulus unpredictable, intermittent, variable in intensity). This experimental stimulus was delivered during the whole perinatal period. A group of four pregnant female served as controls and was kept in standard housing conditions and the offspring was studied in the same manner as the experimental pups.

Results show that experimental pups display more trait anxiety and a transient increase in state anxiety compared to control pups. They also lack habituation in the open-field test and in the elevated plus maze. Spatial learning is slowed and memory consolidation is impaired in the Morris Water Maze. A lack of cognitive flexibility and/or working memory was observed in prefrontal cortex oriented tasks (alternation task). No differences were found on motor abilities *per se*.

These results show that a stressed stimulation during perinatal period induce behavioural anxiety on the offspring and frontal tasks seem to be particularly vulnerable to this stimulation.

Keywords: Anxiety, perinatal stress, learning, pregnancy, offspring, rat.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	IV
REMERCIEMENTS.....	IV
I. INTRODUCTION	1
1. L'ANXIÉTÉ.....	1
1.1. Mesures de l'anxiété.....	2
1.2. Tests comportementaux.....	4
1.2.1. Anxiété d'état.....	4
1.2.1.1. Le test en champs ouverts ou "open-field".....	4
1.2.1.2. Le labyrinthe en croix surélevé ou "elevated plus maze"	5
1.2.2. Anxiété de trait.....	8
1.2.2.1. Le test d'émergence ou "light/dark emergence task".....	8
1.2.3. Mesures comportementales de l'apprentissage	10
1.2.3.1. Les labyrinthes aquatiques.....	10
1.2.3.2. Version allocentrique : Piscine de Morris.....	11
1.2.3.3. Version alternance	12
1.2.4. Mesures psychomotrices	13
1.2.4.1. Retournement.....	13
1.2.4.2. Grille vertical	14
1.2.4.3. Agrippement	14
2. STRESS ET PÉRINATALITÉ	14
2.1. Induction de la réponse anxieuse chez les petits.....	16
2.2. Processus gestationnel.....	17
2.2.1. L'organogenèse	18

2.2.2. L'histogenèse.....	18
2.3. <i>Relation mères/petits</i>	21
2.3.1. Influences intra-utérines.....	21
2.3.2. Influences extra-utérines.....	22
3. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES EXPÉRIMENTALES.....	23
3.1. <i>Objectifs de l'étude</i>	23
3.2. <i>Hypothèses expérimentales</i>	24
3.2.1. Hypothèse générale.....	24
3.2.2. Hypothèses spécifiques.....	24
CONTRIBUTION DES AUTEURS	25
II. EFFECTS OF CHRONIC STRESS DURING THE PERINATAL PERIOD ON EMOTIONAL AND COGNITIVE ABILITIES IN RAT PUPS.....	26
ABSTRACT	27
1. INTRODUCTION.....	29
2. METHODS	32
2.1. ANIMALS	32
2.2. ENVIRONMENTAL CONDITIONS	33
2.2.1. <i>Stressful environment</i>	33
2.2.2. <i>Quiet environmental conditions</i>	34
2.3. BEHAVIORAL MEASURES	34
2.3.1. <i>Motor abilities</i>	34
2.3.1.1. The reversal test.....	34
2.3.1.2. The vertical rise.....	34
2.3.1.3. Agrippement	34
2.3.2. <i>Anxiety</i>	35
2.3.2.1. Open-field	35
2.3.2.2. Elevated-Plus Maze.....	36
2.3.2.3. Dark box Emergence test	36
2.3.3. <i>Spatial learning</i>	36
2.3.4. <i>Anhedonia test</i>	38
2.4. STATISTICAL ANALYSIS	38

3. RESULTS.....	39
3.1. GENERAL RESULTS	39
3.1.1. Ponderal evolution.....	39
3.1.2. Litter size	39
3.1.3. Sex ratio	39
3.1.4. Spontaneous abortion	40
3.2. BEHAVIORAL RESULTS	40
3.2.1. Motor abilities.....	40
3.2.2. Anxiety	40
3.2.2.1. Open-field	40
3.2.2.2. Elevated-plus maze	41
3.2.2.3. Dark Box Emergence test.....	42
3.2.3. SPATIAL LEARNING.....	42
3.2.4. ANHEDONIA TEST	44
4. DISCUSSION	44
FIGURES	49
TABLES	60
ACKNOWLEDGEMENTS	61
REFERENCES	62
III. DISCUSSION.....	74
INTERPRÉTATION.....	79
1. Perturbations in utéro au stade gestationnel.....	79
2. Problèmes de maturation durant les deux premières semaines de vie des petits.....	81
3. Perturbation par influence directe du stimulus sur le niveau de stress des petits	82
4. Perturbation par modification du comportement maternel	83
IV. CONCLUSION	86
V. BIBLIOGRAPHIE	88

Liste des tableaux

Tableau : Développement embryogénique des aires du cerveau chez le rat. Adaptaté de Weinstock 2001.

Table 1: Number of success for two successive attempts.

Table 2: Number of attempts before two successive successes.

Liste des figures

Fig.1. Ponderal evolution

Fig.1A. Comparison of increase in body weight in control and stressed females. Each histogram indicates mean weight \pm SEM during the whole gestational period.

Fig.1B. Comparison of increase in body weight in control and experimental (stressed) pups during the twenty five first days of life. Each symbol indicates mean weight \pm SEM.

Fig.2. Open-field at PN15

Fig.2A. Comparison of time spent in the center of arena (**= $p < .005$) between control and experimental pups. Each histogram indicates mean time \pm SEM during the whole 15min period.

Fig.2B. Comparison of number of movements in the center of the arena (*= $p < .05$) between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the whole 15min period.

Fig.2C. Comparison of number of movements along the periphery of the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the whole 15min period.

Fig.2D. Comparison of number rearing in the arena ($*=p<.05$) between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the whole 15min period.

Fig.3. Open-field at PN30 when data were broken down in three 5 minute periods

Fig.3A. Comparison of number of movements along the periphery of the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3).

Fig.3B. Comparison of number of movements in the center of the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3). Difference was significant ($**=p<.005$) only for control group between first and second period.

Fig.3C. Comparison of number of rearing in the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3). Difference was significant ($++=p<.001$) for control group only between first and second period. Difference was also significant for experimental group ($*=p<.05$) between first and second period and ($**=p<.005$) between second and third period showing a deficit in habituation processes.

Fig.3D. Comparison of time spent in the center of arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean time \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3).

Fig.4. Elevated-Plus maze at PN34

Fig.4A. Comparison of time spent in the closed arms of the elevated-plus maze between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during the three five-minute periods (5, 10, and 15min). There was significant difference ($*=p<.05$) between the two groups for the second 10min period.

Fig.4B. Comparison of number of entries in the closed arms of the elevated-plus maze between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during the three five-minute periods (5, 10, and 15min). There was also significant difference ($*=p<.05$) between the two groups for the second 10min period.

Fig.5. Dark Emergence Box at PN34

Fig.5. Comparison of time needed to escape with two and four paws from the dark box emergence test between control and experimental pups. Each histogram indicates mean time \pm SEM during the whole 10min period. There was significant difference ($*=p<.05$) between the two groups for the two paw criterions.

Fig.6. Spatial learning from PN21 until PN27

The allocentric version

Fig.6A. Comparison of time needed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during the six days of the allocentric task.

Fig.6B. Comparison of number of quadrants crossed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean number \pm SEM during the six days of the allocentric task.

The alternate version

Fig.6C. Comparison of time needed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during the six days of the alternate task. There was significant difference ($*=p<.05$) between the two groups at day six of learning session.

Fig.6D. Comparison of Number of quadrants crossed needed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean number \pm SEM during the six days of the alternate task.

Fig.7. Sucrose intake at gestational days 7, 14 and 21

Fig.7. Comparison of sucrose solution and tap water intake between control and stressed mothers at gestational days 7th, 14th and 21st. Each symbol indicates the mean volume \pm SEM drunk by each group.

Liste des abbreviations

ANOVA	Analyse de la variance
CNS	Central nervous system
CP	Control pups
CRH	Facteur de libération de la corticotropine
CS	Control sucrose
CW	Control water
dB	Décibels
E	Embryonnaire
EP	Experimental pups
Fig.	Figure
HHS	Hypothalamo-hypophysaire surrénalien
HPA	Hypothalamo-pituitary axis
LSD	Différence significative la plus petite
MWM _{allo}	Morris water maze allocentrique
MWM _{alt}	Morris water maze alternance
n	Number
NS	Non significant
PN	Posnatal
SEM	Erreur type de la moyenne
SS	Stressed sucrose
SW	Stressed water

*À la mémoire de Salimatou Barry,
Repose en paix et reçois à travers ce
travail l'expression de mon amour et de
ma reconnaissance.*

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de recherche Dr Roger Godbout et Dre Nathalie Le Marec pour m'avoir accueilli au sein de leur Laboratoire de Neurobiologie du Développement et de Neurosciences Comportementales. Je vous remercie pour votre contact chaleureux, vos connaissances scientifiques, votre encadrement et votre soutien inestimable qui m'ont été d'une aide appréciable dans la réalisation de ce travail. Je vous remercie pour tout.

Ma gratitude va à Boubacar Pasto Wann que je tiens à remercier très chaleureusement pour ses conseils de frère et son soutien inestimable depuis notre première rencontre.

J'adresse ma vive reconnaissance à mon père, à ma mère et à mes oncles, particulièrement à Mamadou Alpha Bah et Dr. Mamadou Kabirou Bah pour leur soutien inestimable tout au long de mes études.

Je tiens à remercier le personnel technique de l'animalerie du Centre de Biomédecine de l'Hôpital Sacré-Cœur qui m'a toujours apporté son aide lors de mes travaux de recherche.

J'exprime également toute ma reconnaissance au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour son appui financier à cette étude et l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) dans son Programme de

Bourses CIME (Cursus Intégré pour la Mobilité des Étudiants) pour avoir financé ma première année d'études au Canada.

Enfin, ma gratitude va à tous ceux, qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

I. Introduction

1. L'anxiété

L'anxiété est l'anticipation émotionnelle d'une situation aversive, difficile à prévoir et à contrôler et qui va probablement se produire (Doron et Parot, 1991). C'est donc un état émotionnel et comportemental exprimé dans des conditions environnementales aversives qui peut être atténué ou augmenté par l'administration spécifique de médicaments anxiolytiques ou anxiogènes respectivement (Ramos et Mormède, 1998). Un niveau normal d'anxiété peut être considéré comme une réponse adaptative normale à un agent aversif (Clément et al., 2002) mais des niveaux excessifs d'anxiété causent la détresse et dans des cas plus sévères se manifestent sous forme de troubles pathologiques (Finn et al., 2003).

Classiquement, on distingue deux formes d'anxiété, soit l'anxiété "d'état" et l'anxiété de "trait" (Wall et Messier, 2001; Belzung et al., 1994; Spielberger, 1966). L'anxiété d'état est une forme réactive qui se manifeste seulement en présence du stimulus. Au contraire, le niveau d'anxiété de trait ne varie pas d'un moment à un autre et est considéré comme une caractéristique permanente d'un individu (Wall et Messier, 2001; Beuzen et Belzung, 1995; Lister, 1990). Pour certains auteurs comme File (1991), l'anxiété d'état est présenté comme étant déterminé environnementalement, tandis que l'anxiété de trait serait sous l'influence des composantes génétiques. Clément et collaborateurs (2002) ont d'ailleurs montré que plusieurs loci (Mpmv-9, Bgl, Amy 1, localisés respectivement sur les chromosomes 3, 9 et 3, 6 et 12) sont associés aux

comportements anxieux. Mais, l'anxiété est un phénomène complexe, induit non seulement par des facteurs génétiques ou environnementaux, mais aussi par des interactions multiples entre la génétique et les facteurs environnementaux et entre les gènes eux-mêmes (Clément et al., 2002).

Dans le présent mémoire, je vais vous présenter en détails les variables dépendantes de l'étude, mais également la variable indépendante qui se traduit par une stimulation auditive (aboiements canins) pendant une période maturationnelle extrêmement sensible du développement. Ladite période est celle qui s'étend du jour 1 de la gestation au jour 15 de vie postnatale de la progéniture, autrement dit toute la période périnatale.

1.1. Mesures de l'anxiété

L'anxiété est un phénomène émotionnel commun chez l'homme qui a été décrite par des symptômes psychologiques comme le souci, l'agitation, ou la crainte et des symptômes physiologiques comme la transpiration, l'élévation du rythme cardiaque, ou le tremblement (Finn et al., 2003). Chez les rongeurs, l'anxiété peut être définie par une quantification de comportement exploratoire, la défécation et la miction (Ossenkopp et al., 1994; Lister, 1990). En effet les différents tests utilisés sont basés sur la capacité du rat à explorer un nouveau champ (situation habituellement aversive) et de rester dans un champ protégé (situation habituellement sécurisante) pour s'échapper des prédateurs. Les études sur le comportement anxieux utilisent différents paradigmes (protocoles) incluant

le test en champs ouverts "*open-field*" (Clément et al., 1995; Peeler et Nowakowsky, 1987), le labyrinthe en croix surélevé "*elevated plus maze*" (Griebel et al., 2000; Agmo et al., 1999), la boîte d'émergence "*light/dark emergence task*" (Griebel et al., 2000; Crawley et al., 1997; Beuzen et Belzung, 1995; Misslin et al., 1989).

Les divers modèles animaux d'anxiété chez les rongeurs visent donc les différents comportements naturels, basés sur l'exploration spontanée et l'évitement de situations nouvelles. Il s'agit généralement de situation où l'animal doit apprendre à appréhender les situations expérimentales qui sont basées sur des motivations contradictoires (sécurité/aversion) (Finn et al., 2003; Crawley, 1999). Les stimuli aversifs peuvent varier dans leur nature, d'aucuns peuvent être physiques (par exemple les températures extrêmes, les décharges électriques, la privation de nourriture, l'immersion dans l'eau), d'autres sont considérés comme étant psychologiques (par exemple les environnements nouveaux, les champs fortement illuminés, les champs ouverts, les hauteurs, l'instabilité sociale). Une variable complémentaire de l'expression du comportement anxieux est la capacité de l'animal à éviter le stimulus aversif. Dans certains cas, aucun choix n'est offert à l'animal, tandis que dans d'autres, l'animal peut choisir entre l'approche ou l'évitement du stimulus (Ramos et Mormède, 1998). La majorité de ces tâches utilise des comportements d'approche-évitement chez les rongeurs qui paraissent refléter la réponse d'un rongeur en conflit dans son environnement naturel (Finn et al., 2003).

Par ailleurs, il été montré dans la littérature que les animaux qui présentent un niveau d'anxiété élevé peuvent également avoir des difficultés d'apprentissage (Lupien et McEwen, 1997; McEwen et Sapolsky, 1995) et motrices (Lepicard et al., 2003; Van de Berg et al., 2003; Metz et al., 2001). C'est pourquoi, dans cette étude, nous allons tenir compte de ces deux variables contaminantes (voir plus loin).

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons faire une description des tests comportementaux (variables dépendantes et variables contaminantes) qui ont été choisi dans ce mémoire.

1.2. Tests comportementaux

1.2.1. Anxiété d'état

1.2.1.1. Le test en champs ouverts ou "open-field"

L'activité dans un champ ouvert est la mesure la plus vieille et la plus simple du comportement anxieux chez les rongeurs (Henderson, 1967; Hall, 1936). Le test en champs ouverts permet d'évaluer les effets des manipulations environnementales ou des facteurs génétiques sur l'anxiété d'état des rongeurs (Wall et Messier, 2001; Ramos et Mormède, 1998). Le dispositif est connu pour présenter un conflit entre la tendance naturelle du rongeur à explorer activement un environnement nouveau afin d'établir des repères pour se faire une représentation de son environnement et sa difficulté de s'aventurer loin d'une paroi qui lui offre la sécurité relative des prédateurs (Finn et al.,

2003). Le dispositif est constitué d'un large champ ouvert et illuminé au planché quadrillé et aux parois élevées dans lequel l'animal est placé pour la durée du test et n'ayant aucune possibilité de fuite. La locomotion spontanée exploratoire, la proximité aux parois et du secteur central sont évaluées pendant une période de 5-15 minutes (Finn et al., 2003; Thullier et al., 2002).

Dans notre étude, nous avons utilisé le test en champs ouverts pour évaluer l'anxiété d'état des rats pour une durée de 15 minutes par animal. Un animal très actif en périphérie et très peu actif au centre du champ ouvert est considéré comme ayant un haut niveau d'anxiété (Finn et al., 2003). Les variables dépendantes mesurées que sont la répartition de l'activité en périphérie versus au centre, le temps passé dans chaque zone (périphérie versus le centre), nous indiquent le niveau d'anxiété des rats; et le nombre de redressements indiquant la prise d'information des indices environnementaux (habituation). Entre chaque essai, le dispositif est soigneusement nettoyé avec un mélange d'eau et d'alcool à 10% pour éliminer toute trace olfactive du précédent essai.

1.2.1.2. Le labyrinthe en croix surélevé ou "elevated plus maze"

Un des tests de modèles animaux d'anxiété le plus documenté et le plus pharmacologiquement validé est le labyrinthe en croix surélevé (Trullas et Skolnick, 1993; Lister, 1987; Pellow et al., 1985). Les souris et les rats performant de façon similaire au labyrinthe en croix surélevé (Crawley, 1999) et les analyses de distribution des souches (lignées) indiquent qu'il y a une contribution génétique des niveaux de base

de l'anxiété mesurée sur cette tâche (Rodgers et Cole, 1993; Trullas et Skolnick, 1993). Le labyrinthe en croix surélevé mesure l'anxiété d'état des animaux (Wall et Messier, 2001). Il est basé sur le conflit qu'à l'animal à explorer son environnement et l'aversion pour les espaces ouverts sur le vide (Crawley, 1999; Montgomery, 1955). Le dispositif est formé de quatre branches (deux branches fermées et deux branches ouvertes sur le vide) qui s'étendent d'une plate-forme centrale et a la forme d'une croix, le tout supporté par un pied s'élevant à une certaine hauteur au dessus du sol (Hogg, 1996; Lister, 1987; Pellow et al., 1985; Montgomery, 1955). Au début du test, l'animal est placé sur la jonction centrale des quatre branches le museau orienté vers l'une des branches ouvertes et on laisse l'animal explorer librement son environnement environ 5 à 15 minutes (Torras-Garcia et al., 2005; Crawley, 1999). L'entrée dans les branches ouvertes ou fermées du labyrinthe est déterminée lorsque le raton a ses quatre pattes à l'intérieur de l'une ou l'autre section des branches (Lister, 1987; Pellow et al., 1985). Il arrive quelque fois que le raton ne se trouve ni dans les branches fermées, ni dans les branches ouvertes, dans ce cas, il se trouve dans le carré central qui sépare les quatre branches ouvertes et fermées (Hogg, 1996). Le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans les branches ouvertes et fermées sont mesurés. Les rongeurs préfèrent les branches fermés du dispositif (sécuritaires) et généralement l'index d'anxiété est le pourcentage des entrées dans les branches ouvertes (aversives) ou le temps passé dans celles-ci. Un animal montrant une diminution des entrées dans les branches ouvertes ou du temps passé est considéré comme ayant un niveau d'anxiété accru (Finn et al., 2003). Dans

certains cas, les mesures d'anxiété sont exprimées en pourcentage d'entrée dans les branches ouvertes et fermées et en pourcentage de temps passé dans les branches ouvertes et fermées (Wall et Messier, 2001; Rodgers et Dalvi, 1997; Lister, 1987; Pellow et al., 1985). Le temps passé au centre peut varier entre des groupes (par exemple le traitement par les médicaments ou la modification génétique). On ne connaît pas vraiment ce que ce paramètre reflète, mais il a été suggéré qu'il peut toucher au processus décisionnel et/ou d'évaluation du risque (Rodgers et Johnson, 1995; Cruz et al., 1994). Dans d'autre cas, les mesures d'anxiété sont exprimées en nombre d'entrée et en temps passé dans les branches ouvertes et fermées du labyrinthe (Torras-Garcia et al., 2005; Crawley, 1999). Lister (1987) a montré que les paramètres comportementaux mesurés dans le labyrinthe fournissaient deux facteurs indépendants, l'un reflétant l'anxiété et l'autre l'activité motrice. Il apparaît que le comportement des animaux dans le labyrinthe est aussi affecté par les variations dans l'anxiété de trait (c'est-à-dire la différence des souches), mais les résultats pharmacologiques sont plus sensibles aux différences induites expérimentalement dans l'anxiété d'état (Hogg, 1996).

Dans notre étude, nous avons choisi d'exprimer le niveau d'anxiété d'état des rats par le nombre d'entrée et le temps passé dans les branches ouvertes et fermées. La durée du test était de 15 minutes et entre chaque essai, le dispositif était soigneusement nettoyé avec un mélange d'eau et d'alcool à 10% pour éliminer toute trace olfactive du passage précédent.

1.2.2. Anxiété de trait

1.2.2.1. *Le test d'émergence ou "light/dark emergence task"*

L'émergence du milieu sombre vers le milieu éclairé comme mesure de l'anxiété de trait est basée sur le conflit entre la tendance qu'a un rongeur d'explorer un environnement nouveau et les propriétés aversives d'un champ ouvert vivement illuminé (Crawley, 1999; Crawley, 1985). Le dispositif est une boîte rectangulaire complètement opaque avec une porte donnant accès à un champ ouvert et fortement illuminé. Le comportement de l'animal est mesuré pendant 10 minutes (Crawley, 1999; Ramos et Mormède, 1998). Les variables dépendantes mesurées sont habituellement le nombre de transitions et le temps passé dans chacune des sections du dispositif : la chambre obscure ou le champ ouvert (Crawley, 1999). Un rongeur montrant une augmentation du temps passé dans la chambre obscure serait interprété comme ayant un niveau élevé d'anxiété. La latence pour quitter la chambre obscure (tâche d'émergence) ou la latence pour entrer dans la chambre obscure (tâche de transition) peuvent aussi être employée comme un index d'anxiété. Une latence accrue pour quitter la chambre obscure (la tâche d'émergence) ou une latence faible pour entrer dans la chambre obscure (la tâche de transition) reflète aussi une augmentation de l'anxiété (Finn et al., 2003; Crawley, 1999). Dans notre étude, nous avons considéré la latence d'émergence des deux pattes (indice d'hésitation), puis des quatre pattes pour quitter la chambre obscure. Si l'animal ne sort pas durant le temps alloué, il est retiré et remis dans sa cage. Entre chaque essai, le

dispositif est soigneusement nettoyé avec un mélange d'eau et d'alcool à 10% pour éliminer toute trace olfactive du précédent essai.

L'anxiété est donc un phénomène très complexe dans lequel des variables contaminantes comme l'apprentissage et les performances motrices peuvent s'y rattacher. Nous allons contrôler ces variables en évaluant l'apprentissage des rats par le test de la piscine de Morris donc une version allocentrique du labyrinthe aquatique (Morris, 1982) et dans le labyrinthe aquatique en T (Beaulieu et Godbout, 2000) et par les tests moteurs (Patin et al., 2004; Lepicard et al., 2003; Joyal et al., 2001; Metz et al., 2001; Joyal et al., 1996).

Comme annoncé plus haut, tous ces tests d'anxiété comportent aussi des éléments comportementaux non spécifiques qui peuvent agir comme des facteurs contaminants. Le plus évident est la qualité de la motricité car si un animal a des difficultés locomotrices il ne peut obtenir les mêmes résultats comportementaux que des animaux témoins sans pour autant que l'anxiété ne soit compromise. De plus, il a fréquemment été montré dans la littérature que les animaux ayant un niveau d'anxiété élevé présentent aussi des déficits moteurs (Rudrauf et al., 2004; Lepicard et al., 2003). En outre, les tests utilisés peuvent contenir une autre variable contaminante qui est celle de l'apprentissage. En effet, lors des tests en champs ouverts, ou du labyrinthe en croix surélevé, l'animal peut avoir une réduction de l'exploration de son environnement uniquement à cause d'un apprentissage d'habituation. Chapouthier et Venault (2002)

montrent que les animaux ayant un niveau d'anxiété élevé ont des problèmes d'apprentissage.

C'est pourquoi toute évaluation devrait toujours inclure une ou plusieurs de ces variables contaminantes. Dans ce mémoire, nous allons étudier une des formes de la performance motrice par des tests psychomoteurs et les capacités d'apprentissage des animaux dans des labyrinthes aquatiques.

1.2.3. Mesures comportementales de l'apprentissage

1.2.3.1. Les labyrinthes aquatiques

Établie par Morris (1984), la piscine est constitué d'un bassin circulaire de 150 cm le diamètre, 50 cm de profondeur, rempli de 25 cm d'eau rendue opaque par ajout de lait en poudre. La piscine est virtuellement subdivisée en quatre quadrants. Une plateforme (20x20cm, 23cm de haut) submergée par 2cm d'eau et placée à 30cm de la paroi a été placée dans un des quadrants. Chaque raton est évalué individuellement. Il est d'abord familiarisé avec l'équipement en le plaçant sur la plateforme submergée pour un maximum de 2 minutes. S'il quitte la plateforme, on le laisse nager pour ensuite le replacer sur la plateforme pour les 15 dernières secondes des 2 minutes de familiarisation.

Après cette période de familiarisation, les essais commencent. Tout d'abord, le raton est immergé dans un des quadrants du bassin, la face ventrale contre la paroi et à

ce moment précis, on part le chronomètre. Le temps de nage alloué pour retrouver la plateforme est habituellement de 60 secondes. Cependant, compte tenu de l'âge des animaux, ce temps a été fixé à 40 secondes par animal dans notre étude. Les tests avaient donc lieu à PN21 soit trois semaines après la naissance des ratons (Jett et al., 1996). Si l'animal ne retrouve pas la plateforme durant le temps imparti, il est placé sur celle-ci pour 15 secondes, puis replacé dans sa cage et on passe au suivant. S'il trouve la plateforme, on le laisse également pendant 15 secondes pour prendre les indices de son environnement (indices distaux collés aux quatre coins de la pièce en plus des deux expérimentateurs placés toujours aux mêmes endroits). On a également réduit le nombre d'essais par jours qui est habituellement de six et avons réalisé quatre essais par jours pendant six jours consécutifs, le temps entre chaque essai est de 30 minutes. Au sixième jour on réalise le test de réminiscence ("*probe test*") qui consiste à enlever la plateforme et voir si l'apprentissage est bien consolidé. Au septième jour, on réalise le test de la plateforme visible. Dans ce dernier cas, on n'ajoute pas de lait à l'eau et on accroche un indice visuel sur la plateforme (indice proximal) afin de s'assurer que les animaux ne présentent pas de troubles visuels (Beaulieu et Godbout, 2000; Crawley, 1999; Crawley, 1997).

1.2.3.2. Version allocentrique : Piscine de Morris

Il s'agit de la version décrite par Morris (1984). Pour chaque essai, le raton part d'un quadrant différent au quadrant de l'essai qui l'a immédiatement précédé. Pour chaque essai successif, le raton se sert des indices environnementaux entourant la piscine

pour des associations et estimer l'emplacement de la plateforme cible (Beaulieu et Godbout, 2000). Ce type de performance exige un hippocampe intact (Morris et al., 1982). Chez les rongeurs, l'altération de l'hippocampe entraîne un déficit dans les processus d'acquisition et de mémorisation et les apprentissages spatiaux (Luine et al., 1994; Shors et al., 1992).

1.2.3.3. Version alternance

Cette procédure a été décrite en détail par Beaulieu et Godbout (2000). Il s'agit d'une adaptation du labyrinthe en T dans la piscine de Morris par Beaulieu et Godbout (2000). Brièvement, les rats sont placés dans la même piscine que dans la version allocentrique. Par contre, la position de la plateforme alterne entre deux quadrants (la position "initiale" et la position "alternée") tandis que les rats partent toujours de la même position. Ce type de performance fait appel au cortex préfrontal médian aussi bien chez l'humain que chez l'animal (Le Marec et al., 2002; Verin et al., 1996; Granon et al., 1994; Divac et al., 1975). Le Marec et collaborateurs (2002) ont montré que la lésion du cortex préfrontal médian par l'acide iboténique est associée avec un déficit de la mémoire de travail dans ce type de tâche.

Les variables dépendantes dans les deux cas sont le nombre de quadrants traversés, le nombre de fois où le rat a obtenu deux succès consécutifs et le temps pris pour retrouver la plateforme cible.

1.2.4. Mesures psychomotrices

Plusieurs études ont montré que le stress peut affecter négativement les capacités motrices (Lepicard et al., 2003; Van de Berg et al., 2003; Metz et al., 2001) et les capacités d'apprentissage (Lupien et McEwen, 1997; McEwen et Sapolsky, 1995) des animaux. Van de Berg et collaborateurs (2003) ont montré que les tests moteurs réalisés chez des rats révélaient des effets subtiles sur la performance motrice, c'est-à-dire une faible diminution dans l'activité motrice. Ceci serait dû à une perte neuronale et une déplétion des neurotransmetteurs dans le striatum qui assure le contrôle moteur, l'intégration sensorimotrice et l'apprentissage (Van de Berg et al., 2003). Nous avons donc décidé de tester les capacités psychomotrices des rats à PN15 en utilisant des tests psychomoteurs (Patin et al., 2004; Joyal et al., 2001; Joyal et al., 1996) afin de contrôler ce paramètre. La grille que nous avons utilisée est caractérisée par les dimensions suivantes : 35cm de long, 25cm de large et 3cm d'épaisseur. Sa surface est recouverte par une grille aux mailles de 2mm² chacune.

1.2.4.1. Retournement

Les rats sont placés sur un plateau incliné formant un angle de 45°, la tête orientée vers le bas. Le temps que met le raton pour se retourner en ramenant sa tête dans une position stable (tête vers le haut) est le chronométré.

1.2.4.2. Grille vertical

Le rat est placé au bas de la grille et le temps mis pour atteindre le sommet est chronométré. On observe ainsi la coordination du mouvement, la locomotion sur la grille. La variable dépendante ici mesurée est le temps mis pour positionner les deux pattes de devant au sommet de la grille.

1.2.4.3. Agrippement

Ce test permet de vérifier la capacité du raton à s'accrocher à un fil qui stimule sa face palmaire lorsqu'il se retrouve en état de déséquilibre (Patin et al., 2004). Le raton est alors placé sur une grille aux mailles de 2mm² située à environ 10cm au dessus d'un coussin de mousse pour amortir la chute du raton. La latence de chute est ainsi chronométrée.

2. Stress et périnatalité

Il existe plusieurs façons d'induire de l'anxiété dont le stress. Le stress est un concept dont le sens est très large et, selon le champ d'étude auquel on s'intéresse, peut être défini de plusieurs manières. Pour Relier (2001), le stress est défini comme une panne dans l'équilibre physiologique et/ou psychologique et pour Selye (1956), pionnier dans l'étude du stress, «le stress est l'état rendu manifeste par un syndrome spécifique comportant tous les changements non spécifiques intervenant dans un système biologique».

Il est nécessaire de définir notre interprétation du concept stress. Dans cette étude, nous entendons par stress toute réponse d'un organisme aux stimuli environnementaux (stresseurs) qui menacent son équilibre interne aussi appelé homéostasie et pouvant induire des désordres comportementaux.

Au nombre des stresseurs, les études animales et humaines rapportent les facteurs environnementaux tels que les températures extrêmes (Jedema et al., 2001; 1999) et le bruit (Rabat et al., 2005; Creel et al., 2002; Nelson, 2000); les facteurs physiologiques tels que la privation d'eau et de nourriture (Datta et al., 2000), les infections (Bilbo et al., 2005; Russell et Brunton, 2005) et les facteurs psychosociaux tels que le regroupement de plusieurs rats dans une même cage pendant six semaines (Bernatova et Csizmadiova, 2005).

L'exposition des femelles gestantes au stress a été utilisée comme moyen d'altération du comportement de la progéniture plus tard dans leur vie (Koenig et al., 2005). En effet, des études ont montré que l'exposition au stress durant la dernière semaine de gestation entraîne une reprogrammation de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien du fœtus (Weinstock, 2001; Welberg et Seckl, 2001). Ces changements dans la fonction de l'axe HPA semblent surgir comme la conséquence d'une diminution sélective dans l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe (Barbanzanges et al., 1996; Henry et al., 1994). Batuev et collaborateurs (1996) ont montré que des rats âgés d'un mois issus de mères stressées durant la gestation

présentaient des niveaux de locomotion faible et d'anxiété élevée comparés aux rats issus de mères témoins.

2.1. Induction de la réponse anxieuse chez les petits

Il existe plusieurs façons d'induire une réponse anxieuse. Certains sont d'ordre physiologique et utilisent souvent les voies de la douleur, comme la stimulation nociceptive électrique ou thermique (Palma et al., 2000; Endo et al., 1999; Lordi et al., 1997) ou une raréfaction d'oxygène (Caston, 1992). D'autres sont plutôt d'ordre psychologique et font appel à une menace mettant en jeu la survie ou l'intégrité physique de l'animal, comme l'évocation olfactive ou auditive d'un prédateur (Neumann et Collins, 1991) ou font appel à une peur intrinsèque de l'animal comme la peur du milieu aquatique (Morrow et al., 2000; Tanaka, 1999; Coll-Andreu et al., 1989). Il a été montré que différents agents stressants induiront des altérations comportementales différentes. De plus, un même stress n'aura pas le même impact sur l'organisme selon qu'il est administré de façon aiguë ou chronique (Lordi et al., 2000; Lordi et al., 1997) et la prédictibilité plus ou moins grande de l'événement stressant déterminera les réactions de l'organisme. Néanmoins pour qu'une stimulation soit stressante il faudra que l'animal ne puisse avoir aucun contrôle sur sa probabilité d'apparition pour éliminer toute possibilité d'habituation. Amat et collaborateurs (1998) ont montré que si l'on a la possibilité de stopper l'événement stressant, les réactions adaptatives seront moindres.

Dans ce présent mémoire, nous avons utilisé des aboiements canins comme stimulus stressant. Les femelles gestantes sont soumises aux aboiements diurnes imprévisibles, intermittents et variables en intensité (aucun indice environnemental ne peut prédire leur déclenchement ni leur intensité, il n'y donc pas d'habituation possible). Les aboiements de chiens proviennent d'un chenil situé à proximité de l'animalerie de nos femelles gestantes. Il s'agit d'un stress qui est perçu par l'animal comme étant une menace potentielle à sa sécurité et une perturbation de son environnement. Une mesure du taux de décibels est effectuée quotidiennement pour contrôler le niveau sonore du stimulus stressant. Cette mesure a révélé que le taux oscille entre 55 et 75dB, avec une moyenne de 65.5 dB, ce qui est conforme aux normes admises par le Conseil Canadien pour la Protection des Animaux (un taux de 85 dB maximum est toléré en animalerie) et inférieur au seuil de la douleur (120dB). Les progénitures des femelles soumises à de telles conditions sont comparées aux progénitures des femelles témoins élevées dans un environnement standard d'animalerie dont le taux de décibels ambiant est inférieur à 50.

Dans la section suivante, nous allons faire un bref aperçu du développement embryonnaire et fœtal chez le rat.

2.2. Processus gestationnel

La fécondation marque le début de la gestation qui dure chez le rat de 21 à 23 jours (Sharp et LaRegina, 1998). Le développement précoce se déroule dans la lumière de l'oviducte (2 premiers jours), puis de l'utérus, jusqu'à l'implantation du blastocyste

(l'embryon) dans la paroi de l'organe 5 à 6 jours après la fécondation (Witschi, 1956). Le développement embryonnaire est un phénomène que l'on peut subdiviser en deux grandes phases.

2.2.1. L'organogenèse

Elle est caractérisée par la formation et le développement des différents organes du nouvel individu suite à l'implantation du blastocyste entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour dans la muqueuse utérine (Witschi, 1956) puis sa différenciation en trois feuillets : l'ectoderme évoluera en épiderme et en tissu nerveux; le mésoderme donnera naissance à la paroi du tube digestif, et les organes annexes comme le pancréas et le foie; l'endoderme donnera naissance à plusieurs organes (cœur, reins, gonades), aux tissus conjonctifs (os, muscles, tendons) et aux cellules du sang. La formation du tube neural qui dérive de l'ectoderme et la mise en place des principales ébauches organiques se déroulent entre les 9^{ème} et 10^{ème} jours de la gestation.

2.2.2. L'histogenèse

L'histogenèse conduit à la formation et au développement des tissus de l'embryon, au remaniement de ces tissus au cours des métamorphoses ainsi qu'à la formation des vésicules encéphaliques, de l'établissement des connexions synaptiques suivies de leur myélinisation; myélinisation qui, par ailleurs se poursuit au delà de l'histogenèse et contribue à l'établissement des capacités fonctionnelles.

Cette période est particulièrement critique car elle correspond au remodelage synaptique (Walker et al., 2004; Vyas et al., 2002), à la synaptogenèse et à la maturation des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs. Les structures soupçonnées d'être atteintes dans notre étude se développent particulièrement à cette période (voir Tableau). Étant donné que les glucocorticoïdes font partie des hormones stéroïdiennes qui sont lipophiles, elles ont donc la capacité de traverser aisément les barrières biologiques telles que la barrière fœto-placentaire (Seckl, 2004). Ceci pourrait expliquer du moins en partie comment les glucocorticoïdes maternels se retrouvent dans le sang fœtal où ils se lient à leurs récepteurs cibles localisées presque partout dans le cerveau fœtal notamment dans l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal (Speirs et al., 2004; Cole, 1995).

La maturation cérébrale fonctionnelle débute en fin de gestation lorsque les structures fondamentales sont en place. C'est un processus lent et qui se poursuit longtemps après la naissance puisque le rat naît immature (peau nue, yeux fermés, oreilles collées). Il a d'ailleurs été montré que les perturbations durant cette phase ont des conséquences neurodéveloppementales qui perdurent souvent dans le temps voire jusqu'à l'âge adulte pouvant entraîner des troubles émotionnelles, cognitives et cardiovasculaires (Seckl, 2004; McEwen, 2000; Nyirenda et al., 1998). Les hormones de stress (glucocorticoïdes) jouent un rôle principal dans la médiation des réponses adaptatives et inadaptées en interagissant réciproquement avec les aspects spécifiques de la physiologie de chaque tissu (McEwen, 2000). Il a été montré que l'administration

tardive de glucocorticoïdes au cours de la gestation chez les rongeurs réduit significativement le poids des petits à la naissance et prédispose à des problèmes d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie à l'âge adulte (Nyirenda et al., 1998; Purdy et Metzger, 1996).

Tableau : Développement embryogénique des aires du cerveau chez le rat.

Adaptaté de Weinstock 2001.

Régions du cerveau	Stades de développement	
	Embryonnaire (E)	Postnatal (PN)
Locus coeruleus	E11 – E12	
Raphé	E13 – E15	
Formation réticulaire	E12 – E15	
Hypothalamus	E13 – E17	
Hippocampe	E17 – E23	PN1 – PN15
<i>Cellules granulaires du gyrus dentelé</i>		PN3 – PN15
Striatum	E16 – E22	
Amygdale	E13 – E19	
Cortex : couches du néocortex	E15 – E19	

2.3. Relation mères/petits

2.3.1. Influences intra-utérines

De manière générale les hormones stéroïdiennes lesquelles sont d'ailleurs lipophiles sont capables de traverser les barrières biologiques et constituent de puissants médiateurs lors de la construction et de l'organisation du système nerveux survenant très tôt dans la vie (Seckl, 2004). Ceci suggère qu'une exposition prolongée ou chronique à d'autres hormones stéroïdiennes comme les glucocorticoïdes durant la période périnatale peut avoir des effets similaires. La programmation précoce permet expliquer l'association entre les événements environnementaux prénataux susceptibles d'altérer la croissance, le développement fœtal et la physiopathologie plus tard (Seckl, 1998; Csaba, 1986). La programmation reflète donc l'action de tout facteur intervenant durant cette période développementale sensible affectant le développement et l'organisation de tissus spécifiques vulnérables et produisant des effets persistants et pathologiques (Seckl, 2004).

Il a été montré que les glucocorticoïdes ont de puissants effets négatifs sur le développement des tissus. Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont exprimés dans la plupart des tissus fœtaux depuis les premiers stades embryonnaires (Speirs et al., 2004; Cole, 1995). L'expression étroitement liée à l'affinité plus haute des récepteurs aux minéralocorticoïdes a une distribution plus limitée dans les tissus au cours du développement et est présent seulement aux stades tardifs de la gestation, du moins chez

les rongeurs (Brown et al., 1996). En plus, les glucocorticoïdes sont très fortement exprimés dans le placenta (Sun et al., 1997) où ils sont capables de moduler les effets métaboliques et anti-inflammatoires (McEwen, 2000).

2.3.2. Influences extra-utérines

La génétique, l'environnement et le comportement maternel sont d'autres facteurs à considérer lorsque l'on veut comprendre le développement d'un organisme (Walker et al., 2004; Weaver et al., 2004; Meaney, 2001; Relier, 2001). Les influences alimentaires par exemple peuvent s'avérer cruciales non seulement pour régulariser la croissance du nourrisson, mais aussi pour moduler la réponse du système neuroendocrinien au stress, et peut être, influencer certains aspects du développement du cerveau dont l'hypothalamus et l'hippocampe (Walker et al., 2004). Une diète grasse et les changements dans la composition des acides gras des membranes du cerveau sont impliqués dans le développement et la susceptibilité de plusieurs maladies mentales comme la dépression et la schizophrénie. Ces changements ont lieu par la libération des acides gras par les phospholipides via la phospholipase A₂ qui sont immédiatement convertis en série d'écosanoides omega 6 ou omega 3 (Greenwood et Young, 2001). Chez le rat, le stress chronique maternel durant la gestation a été utilisé pour étudier le développement puis la vulnérabilité de la progéniture au stress. Plusieurs protocoles incluant l'injection sous-cutanée journalière de solution saline, l'immersion, la contention, les chocs électriques induisent à long terme chez la progéniture des anomalies comportementales et neurobiologiques durables (Pardon et al., 2000; Lordi et

al., 1997). De plus, il a été montré que des variations dans le comportement maternel notamment le léchage et le toilettage des petits affectent directement le développement de l'hippocampe et la cognition chez les rat (Bredy et al., 2003; Liu et al., 2000). Les petits issus de mères qui ont une grande fréquence de léchages et de toilettage durant la première semaine de vie montrent une augmentation de la densité synaptique de l'hippocampe ainsi qu'une augmentation des capacités d'apprentissage spatial et de la mémoire (Liu et al., 2000). Par ailleurs, Walker et collaborateurs (2004) ont montré que la leptine produite par le tissu adipeux est présente dans le lait maternel et agit sur les structures comme l'hypothalamus, l'hippocampe, l'hypophyse et les surrénales des petits pour réduire l'exposition aux glucocorticoïdes et la réactivité au stress.

3. Objectifs et hypothèses expérimentales

3.1. Objectifs de l'étude

Nous avons vu que l'environnement périnatal était crucial pour la santé de la mère et sa descendance. Peu d'études se penchent simultanément sur une manipulation des environnements prénatal et postnatal afin d'établir quelles pourraient être les conséquences sur la descendance. Nous nous sommes donc intéressés à cette question et afin de perturber toute la période maturationnelle jusqu'à ce que l'ouïe, la vue et la locomotion soient possibles autrement dit de la période fœtale jusqu'à la l'acquisition de capacités fonctionnelles de la progéniture (maturation de l'individu). Nous avons donc infligé un stress chronique périnatal soit du jour 1 de la gestation jusqu'au jour 15 de vie

postnatale de la progéniture. Par la suite nous avons effectué des analyses comportementales et notre attention fut principalement focalisée sur les performances de la progéniture dans l'expression du comportement anxieux mais également dans les sphères de l'apprentissage et de la motricité.

3.2. Hypothèses expérimentales

3.2.1. Hypothèse générale

Vérifier si une stimulation périnatale stressante telle que des aboiements canins est associée à des comportements postnataux anxieux chez la progéniture.

3.2.2. Hypothèses spécifiques

H1 : Les petits des portées stressées montreront une augmentation de l'anxiété d'état sur le labyrinthe en croix surélevé et dans le test en champ ouvert.

H2 : Les petits des portées stressées montreront une augmentation de l'anxiété de trait au test d'émergence.

H3 : Les petits des portées stressées présenteront une altération des capacités psychomotrices.

H4 : Les petits des portées stressées montreront des déficits d'apprentissage dans les deux versions du labyrinthe aquatique.

Contribution des auteurs

Thierno Madjou Bah, Nathalie Le Marec and Roger Godbout (2005). **Effects of chronic stress during the perinatal period on emotional and cognitive abilities in rat pups.** (Will be submitted for publication to Behavioral Brain Research).

Dre Nathalie Le Marec et Dr. Roger Godbout ont supervisé ce projet de recherche. Ils ont aussi contribué à l'analyse des données, à leurs interprétations et à la rédaction du manuscrit.

Quant à moi, j'ai contribué à la conduite des expériences, à la cueillette des données, à leur analyse ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

II. Effects of chronic stress during the perinatal period on emotional and cognitive abilities in rat pups

Thierno Madjou Bah^a, Nathalie Le Marec^{a,b,*} and Roger Godbout^{a,b}

^aBiomedecine Center, Sacré-Cœur Hospital of Montreal

and

^bDepartment of Psychiatry, University of Montreal

Number of text pages: 46

Number of figures: 18

Number of tables: 2

Will be submitted for publication to: Behavioral Brain Research

* Address for correspondence:

Nathalie Le Marec, Ph.D.

Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur

5400 Boul. Gouin Ouest, Montréal (Québec)

Canada H4J 1C5

Phone: (514) 338-2222, ext. 3696

Fax: (514) 338-2694

E-mail: [REDACTED]

Abstract

Pregnancy and the first weeks of life are crucial for the optimal development of offspring. This period corresponds to maximum changes in plasticity and synaptic organization in the central nervous system. Any abnormal activation of the stress systems during perinatal period can have negative effects in anxious behavior. In the present work we studied the consequences, in the rat of perinatal stress on the cognitive and emotional behavior of the offspring.

A group of six pregnant females was subjected to a chronic moderated stress using dogs' barking. This auditory stimulus was unpredictable, intermittent, and its intensity was variable (average: 65.5 dB). This experimental stimulus was delivered from the onset of pregnancy to the fifteenth day of postnatal life of offspring (20 males, 20 females). A group of four pregnant female served as controls and was kept in standard housing conditions and the offspring (20 males, 20 females) was studied in the same manner as the experimental pups.

Results show that rats born from stressed mothers display more trait anxiety and a transient increase in state anxiety compared to control pups. They also lack habituation in the open field test and in the elevated plus maze. Spatial learning is slowed and memory consolidation is impaired in the Morris Water Maze. A lack of cognitive flexibility and/or working memory was observed in prefrontal cortex oriented tasks (alternation task and T-maze test). No differences were found on motor abilities *per se*.

These results show that a stressed stimulation during perinatal period induce behavioural anxiety on the offspring and frontal tasks seem to be particularly vulnerable to this stimulation.

Keywords: Anxiety, perinatal stress, pregnancy, learning, offspring, rat.

1. Introduction

It is already well known that the development of the central nervous system (CNS) depends on the interaction between the organism and its environment. The consequences of such interactions take place as soon as the embryo is implanted in the uterus, i.e. around day 6 of gestation in rodents (Witschi, 1956) and can induce physical or cognitive impairments in the pups (see below). Upon delivery, newborns are still immature and environmental conditions still continue to influence it directly, including maternal care (Liu et al., 1997), malnutrition (Datta et al., 2000), chronobiological measures (Kennaway, 2002), physical stress (Lordi et al., 2000, 1997; Palma et al., 2000; Endo et al., 1999; Koehl al., 1999) or psychological stress (Lordi et al., 2000, 1997; Morrow et al., 2000; Tanaka, 1999; Coll-Andreu et al., 1989).

Stress is a physiological phenomenon by which an organism reacts to aggression or strong stimulations. Any application of acute or chronic stress involves adaptive reactions of the organism. In mammals, the endocrine stress response is mediated through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) leading to the release of glucocorticoids and catecholamines (Valentino et al, 1998; Plotsky, 1991; Thierry et al., 1976). Glucocorticoids also normally activate a serotonin-dependant negative feedback mechanism to terminate the release of corticotrophin-releasing hormone (CRH) in some areas brain such as hippocampus, amygdala, hypothalamus and prefrontal cortex (McEwen, 2000; Lupien et al., 1998). Stress-induced structural changes in the brain have been reported to be related to clinical disorders such as anxiety and depression

(Bakshi and Kalin, 2000; Arborelius et al., 1999; Holsboer, 1999) including post-traumatic stress disorder and individual differences in the aging process (Lupien et al., 1998). Thus, chronic stress will impair the ascending serotonergic neurotransmission, which can explain the increased susceptibility of stressed rats to depression-like behavior (McEwen, 2000). It is also well documented that chronic stress induced structural changes in hippocampus and amygdala that can explain anxiety and cognitive impairment (Vyas et al., 2003; Vyas et al., 2002; Lupien et al., 1998). It is well known that late gestational, prenatal and postnatal periods in most species are characterized by intense process of synaptogenesis and remodeling which underlies the functional maturation of the central nervous system. This process would be influenced by glucocorticoids production. Excess glucocorticoids production is deleterious to brain maturational processes, whereas low adrenal corticosterone secretion in neonatal life allows for adequate brain development (Walker et al., 2004).

To be stressful, a stimulus needs to be uncontrollable, unpredictable and must fluctuate enough in order to avoid habituation processes (Amat et al, 1998). Noise is a stressful agent as it increases the release of stress hormones (Weinstock et al., 2001, 1992; Kay et al., 1998; Dilts et al., 1995) and it can be modulated in terms of intensity and duration (Harkin et al, 2002). Animal submitted to an acoustic chronic stress develop anxiety-like symptoms (File and Fernandes, 1994) and show mild cognitive deficits (Arnsten, 2000). It has been shown for example that children attending a school located close to international airport have increased levels of physiological arousal and stress compared to controls. Moreover, they present an increase of their stress level (Matsui et al., 2004; Evans et al., 1995, 2001). Those children present deficits in focus

attention, in memory test and in reading abilities. Recent ethological study performed in winter have shown that noise generated by snowmobile raise stress hormone levels and increase heart rate of wild animals living in national parks (Creel et al., 2002).

Several behavioral tasks are known to measure anxiety-like symptoms and cognitive abilities in rats. Anxiety-like behavior can be quantified using unconditioned tests such as the elevated plus maze, the open-field box and the dark box emergence test (Lieben et al., 2004; McMillen et al., 1998). Anxiety can be broken down into at least two different phenotypes (Brush, 2003a, 2003b) and each can be selectively tested. State-anxiety is a reactive component experienced at a particular moment, facilitated by the presence of an anxiogenic stimulus. In rats, the most recognized task to quantify state-anxiety is the elevated plus maze in which closed arms of runways offer a more secure environment while open arms constitute an anxiogenic stimulus (Poltyrev and Weinstock, 2004; Leret et al., 2003). The open-field paradigm can also be used to evaluate state-anxiety, the center of the arena being the anxiogenic stimulus (Wartella et al., 2003; Lordi et al., 2000). Trait-anxiety is considered to be an enduring feature, resistant to time and conditions. The dark box emergence test serves to test trait-anxiety (Rondi-Reig et al., 1997). Cognitive abilities can be measured by spatial orientation tasks such as various forms of the Morris water Maze (Le Marec et al., 2002, D'Hooze and Deyn, 2001, Beaulieu and Godbout, 2000; Morris et al, 1982).

The aim of the present study was to verify whether pups born from dams exposed to a noisy environment would present signs of emotional deficits such as anxiety-like symptoms or cognitive deficits such as learning and memory impairments (spatial

impairment). To this end we exposed female rats to barking environment during pregnancy, up to postnatal day 15 (PN15). This postnatal period was chosen because pups are then not able to directly perceive noisy stimuli (not before PN12-PN14). Results of behavioral tests were used as biological markers for anxiety and stress.

2. Methods

2.1. Animals

A total of 150 Long-Evans rat pups (78 males, 72 females) from 10 Long-Evans female (6 stressed and 4 control) rats were born in our facilities for this study. From these a maximum of 80 pups (40 males, 40 females) were used for behavioral measures. Fourteen additional dams were used in the sucrose preference tests to determine whether the experimental procedure induced behavioral depression like anhedonia.

Female rats were acquired through regular trade (Charles Rivers, St-Constant, Quebec, Canada) and mated in our own facilities. Day one of pregnancy was determined by analyses under microscopy of vaginal smear. More precisely the cycle of the female is definite at this moment. Samples containing cells in estrus and the presence of at least a sperm cell allow us to identify the female as probably pregnant. Cages were checked twice a day (8h00 and 18h00) and pups found at that time were considered being born on that day (i.e., postnatal day 1 (PN1)). At birth (i.e. PN1) all pups were weighed and their sexes were determined in order to measure the sex ratio. Then the litter mate was reduced to eight pups (4 males and 4 females) in order to have equal number of animals per dam in control and experimental groups. At gestational day 16, pregnancy is

confirmed or not. The number of supposed abortions is then calculated by making the ratio between females probably pregnant and females which are really pregnant. Dam was weighted daily through the protocol while pups were weighed every five days during the lactating period, i.e. from birth to PN25.

2.2. Environmental conditions

All animals were housed in standard conditions (light-dark cycle: 12/12h, lights on at 08h00; temperature: 21-25°C; relative humidity: 40-45%; food and water *ad libitum*). At day 1 of pregnancy, probably pregnant females were randomly distributed to one of two possible housing environments: stressful or standard (see below). Rat pups were kept with their respective mothers, in the same environmental condition originally assigned at day one of pregnancy until PN15 (Leret et al., 2003, Antonio and Leret, 2000).

2.2.1. Stressful environment

From day 1 of pregnancy to PN15 the experimental group (stressed dams) was housed close to a kernel where frequent, unpredictable, unavoidable and invariable dog barking occurred. Average intensity of barking was 65.5 dB (range: 55-75 dB); this is below the maximum level accepted by the Canadian Council on Animal Care (85 dB) and far from the painful threshold (120 dB). Such a housing condition is strongly suggested to be stressful (Harkin et al, 2002; Arnsten, 2000; File and Fernandes, 1994).

2.2.2. Quiet environmental conditions

Control dams were kept in standard environment conditions and the background noise level was between 35-50 dB.

2.3. Behavioral measures

2.3.1. Motor abilities

At PN15, animal were tested in order to notice their motor ease. Three tests were used: the reversal test, the vertical rise and the grip. The grid we used is characterized by 25cm x 35cm x 3cm and has one square per 2mm².

2.3.1.1. The reversal test

Rats are positioned on an inclined grid with 45 degree, the head directed towards bottom. Time needed to return in a more stable posture (head upwards) was chronometer.

2.3.1.2. The vertical rise

The rat is positioned with at the bottom of the grid and time needed to reach the top is chronometer. The choice's criterion is the position of the two front paws on the top of the grid.

2.3.1.3. Agrippement

The rat is positioned on a turned grid over a thick carpet. The fall latency is chronometer.

2.3.2. Anxiety

Thirty-one experimental pups (EP) born from four females and 24 control pups (CP) born from three females were tested individually; one experimental pup died due to unknown causes. State and trait anxiety were evaluated individually using the following three tests.

2.3.2.1. Open-field

State Anxiety (Wartella et al., 2003 ; Lordi et al., 2000). Twenty-four pups (10 CP from 3 control mothers, 14 EP from 4 stressed mothers) were tested at PN15 (when experimental treatment is still active); at this time, rats had never been exposed to the test before. The same rats were tested again (second exposure) at PN30 (i.e., 15 days after the end of the protocol so that all dams and pups are constantly in a quiet environment). Data from three controls pups could not be analyzed at PN30.

The open-field arena consists of a flat 45cm x 45cm surface bordered with 15cm high white opaque walls. The floor is marked with crossed lines (64 squares of 25cm²) to measure locomotion during a 15-minute period. The periphery included 48 squares (75% of the surface) and the centre 16. The dependent variables were: number of square crossed along the periphery and in the center of the arena; time spent in the center of the arena and the number of rearing. Between each trial, the arena was carefully cleaned with a 10% ethanol solution. Data were further broken down into three five-minute periods. After this test, pups were distributed into two separate groups, one for the elevated plus maze and one for the dark box emergence. Additional pups were added to complete the groups.

2.3.2.2. Elevated-Plus Maze

State anxiety (Poltyrev and Weinstock, 2004; Leret et al., 2003). Ten CP (from 3 mothers) and 14 EP (from 4 mothers) rats were tested at PN34. It consists of two runways (55cm x 10cm) intersecting at 90° and placed on top of a 35cm high beam. Walls of 28cm high bordered one runway while the other was fully open walls. The test was started with the rat being placed at the intersection, head pointing toward an opened arm. Behavior was recorded via a video camera placed above the apparatus. Between each trial, the maze was carefully cleaned with a 10% ethanol solution. Dependant variables were the time spent in each section of the maze and the number of entries in each section.

2.3.2.3. Dark box Emergence test

Trait Anxiety (Rondi-Reig et al., 1997). Eleven CP (from 3 mothers) and 14 EP (from 4 mothers) were studied with the dark box emergence at PN34. This test accounts for neophobia since animals are started in a restricted (17cm x 14cm x 9.5cm high) and dark environment from which they can exit into an opened and lightened open-field as described above. The dependant variable was the latency to emergence, i.e., time needed to leave the dark box towards the open-field, using the front paws or all four paws as the criterion.

2.3.3. Spatial learning

Forty three pups were tested between PN21 and PN27 using two versions of the Morris water maze. Pups were randomly distributed to either the classical version of the Morris water maze (MWM_{allo}) or our own alternation version of it MWM_{alt} (Beaulieu

and Godbout, 2000). Procedure were described in details elsewhere (Beaulieu and Godbout, 2000). Briefly, rats were placed in a pool (150cm diameter, 50cm deep) filled up to 25cm with water made opaque with powder milk and from which they had to escape by finding a submerged platform. In MWM_{allo} , 11 EP (6 males and 5 females) from 3 stressed mothers and 10 CP (5 males and 5 females) from 4 control mothers were started from four different points of the pool corresponding to four differentials and needed to use external cues to find the fixed hidden platform. In MWM_{alt} , ten experimental pups were always started from the same position while the position of the platform alternated between two quadrant locations (i.e., the "initial" and the "alternate" position).

Pups were exposed to four consecutive trials of 40 seconds per day for 6 consecutive days. If trial was failed, the pup was placed on the platform by the experimenter and left there for 15 seconds. The inter-trial interval was 30 min. At the end of the 6th day animals were exposed to a probe test. For this test, no platform was present in the pool and we measured the time spent in the quadrant in which the platform once was. For the MWM_{allo} , the rat started from the center of the pool while the MWM_{alt} the pup started from the same point it started from originally. During the 7th day, pups were tested in the same way but using a visible platform and clear water.

The dependent variables were the number of quadrants crossed, the number of successful trials and the time taken to reach the platform.

2.3.4. Anhedonia test

An independent group of 14 pregnant and the 10 pregnant from the behavioural study (12 stressed, 12 controls) were used to test whether our chronic stress procedure induced depression-like symptoms (i.e. anhedonia). At days 7, 14 and 21 of pregnancy, regular drinking bottles were removed from 8h00 to 10h00 AM and replaced by bottles filled with either tap water or a 1% sucrose solution. At 10h00, the quantity of liquid consumed was measured and regular drinking bottles were put back into place. Females were divided into 4 groups: control with water (CW, $n = 7$), control with sucrose (CS, $n = 5$), stressed with water (SW, $n = 6$) and stressed with sucrose (SS, $n = 6$). The dependant variable is the quantity of liquid consumption (tap water or sucrose).

2.4. Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM; results were using to compare control and pups born from stressed mothers performances. Chi square was used to compare sex ratio, percentage of spontaneous abortion. One-way analyses of variance were applied to compare the performances of the groups (control vs. experimental pups) on weight gain, size of litter, open field, dark box emergence test and elevated plus maze. For open field and elevated plus maze data were broken down into three periods of 5 min to verify time course effects. Analyses of variance (two-factors ANOVA Group x Days) were used with repeated measure on the second factor on the open field apparatus, elevated plus maze, classical version of Morris water maze and in the alternate version, anhedonia test. The least significant difference (LSD) test was used for post-hoc analyses when

needed. The student t-test was also used to compare results for number of success and probe test for spatial memory test.

3. Results

3.1. General results

3.1.1. Ponderal evolution

There is no significant difference of increase body weight in both pregnant female groups (Fig.1A).

Both groups of pups exhibited a very similar weight gain ($F_{(1,5)} = 0.006$; $p > 0.05$) throughout the protocol. More generally, body weight measured every 5 days from birth to PN25 and it is not different (Fig.1B).

3.1.2. Litter size

There is no significant difference between controls and stressed group ($F_{(1,9)} = 0.64$; $p > 0.05$) in the litter size (15 ± 0.34 VS 15 ± 0.48).

3.1.3. Sex ratio

Out of the 94 pups born from the six stressed mothers 40 (42.6%) were males while there was 20 males out of 55 (36.4%) pups born from the four control mothers. Chi square = 2.07, NS).

3.1.4. Spontaneous abortion

45% stressed females have significantly more spontaneous supposed abortions than control females (20%). (Chi square = 14.25, $p < 0.001$).

3.2. Behavioral results

3.2.1. Motor abilities

There were no significant difference between experimental pups and control pups for all parameters measured (data not shown).

3.2.2. Anxiety

3.2.2.1. Open-field

At PN15, global analysis of movement show that rats born from stressed dams spent significantly less time in the center of the arena ($F_{(1,22)} = 4.98$; $p < .005$; Fig.2A) and displayed less amount movement ($F_{(1,22)} = 2.1$; $p > 0.05$; Fig.2B) compared to controls; there were no differences in the amount spent in the peripheral area ($F_{(1,22)} = 0.20$; $p > 0.05$; Fig.2C). Rats born from stressed dams also produced significantly less rearing compared to controls ($F_{(1,22)} = 18.95$; $p < 0.0005$; Fig.2D). When data were broken down into five minute periods, a repeated measure ANOVA showed no interactions between controls and stressed pups in neither of the variable analyzed above ($F_{(2,44)} = 0.06$; $p > 0.05$) for the periphery and the center ($F_{(2,44)} = 0.27$; $p > 0.05$).

At PN30 there were no more differences between the two groups except for rearing ($F_{(1,22)} = 4.53$; $p < 0.05$). However, when results at PN30 were broken down into three five minute periods, we found that only pups born from control dams displayed habituation (Fig.3A-D). The ANOVA showed a significant Group x Period interaction for number of movement in the center of the arena ($F_{(2,38)} = 3.73$; $p < 0.05$; Fig.3B). A post-hoc comparisons show a significant differences ($p < 0.005$) between first and second five minute periods for CP. Only control pups displayed habituation processes. The ANOVA also showed a Group x Period interaction for rearing ($F_{(2,38)} = 5.21$; $p < 0.01$; Fig.3C) and the post-hoc comparisons show significant decreases across five-minute periods in both group (period 1 vs. period 2: controls $p < 0.001$; stressed $p < 0.05$). Only stressed pups are not fully habituated at the second period and they continuous to decrease significantly ($p < 0.005$) the number of rearing.

3.2.2.2. Elevated-plus maze

The total time spent in each arm is not significantly different between two groups (data not shown). Pups born from stressed dams make significantly more entries than controls in closed arms ($F_{(1,22)} = 10.37$; $p < 0.005$) and in the center area of the maze ($F_{(1,22)} = 6.85$; $p < 0.05$). The number of entries in open arms and the time spent in each arm was not significantly different between the two groups (data not shown). When results were broken down into five minute periods, we found an interaction effects ($F_{(2,44)} = 3.57$; $p < 0.05$; Fig.4A-B) in time spent in closed arms. A post-hoc comparison shows that only CP present significant difference between first and second five minute period ($p < 0.0005$).

3.2.2.3. Dark Box Emergence test

At PN34, rats born from stressed dams emerged significantly later than controls, whether using front paws only or the four paws as the criterion ($F_{(1,23)} = 6.37$; $p < 0.05$) and $F_{(1,23)} = 5.65$; $p < 0.05$) respectively (Fig.5).

3.2.3. Spatial learning

Figure 6C and 6D: Alternation task

There is a significant Group x Day interaction in time needed ($F_{(5,100)} = 3.92$; $p < 0.005$) and quadrant crossed to reach the invisible platform ($F_{(5,100)} = 3.22$; $p < 0.01$) in MWM_{alt} , compared to controls. A post-hoc comparison shows that stressed pups rats needed significantly more time to find the hidden platform at day 6 of the learning session (Fig.6C; $p < 0.005$). A second post-hoc comparison shows that performances of stressed pups were significantly more variable in number of quadrants crossed (Fig.6D). In fact, there is a significant difference between performances of day 1 and day 2, between day 2 and day 3 and also between day 3 and day 4 ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively).

A t-test shows less successful trials (Table 1) in the stressed group compared to controls ($t = 2.06$, $df = 20$; $p < 0.05$). The number of success was similar for the initial position of the hidden platform ($t = 0.97$, $df = 20$; $p > 0.05$) but there is a significant difference between two groups when animals needed to find the alternate position of the platform ($t = 2.21$, $df = 20$; $p < 0.05$).

The MWM_{alt} “probe” test showed that both groups of rats spent the same time in the starting area. In the same way, both pups spent the same time in the initial target quadrant (11.2 ± 2.04 seconds versus 9.9 ± 0.92 seconds; $t = -0.53$, $df = 20$; $p > 0.05$). On the other hand, pups born from stressed mothers spend significantly less time in the alternate target quadrant (10.7 ± 1.09 seconds versus 5.0 ± 1.11 seconds; $t = 3.66$, $df = 20$; $p < 0.005$). There is no difference in time needed to find the visible platform in the “cued” test for MWM_{alt} task (data not shown).

Figure 6A and 6B: Allocentric task

A repeated measure ANOVA does not show any interaction between controls and stressed pups in time needed and in quadrants crossed to find hidden platform across days ($F_{(5,95)} = 0.85$; $p > 0.05$; $F_{(5,95)} = 0.82$; $p > 0.05$; Fig.6A and 6B) but there is a significant groups and days effect between the two groups for the time ($F_{(1,19)} = 4.56$; $p < 0.05$ and $F_{(5,95)} = 12.05$; $p < 0.001$, respectively) and for the number of quadrant crossed ($F_{(1,19)} = 7.79$; $p < 0.01$ and $F_{(5,95)} = 4.42$; $p < 0.005$, respectively). In the same way animals from two groups have similar results in two consecutive successful trials. However, there is a significant difference in the total number of success. Stressed pups reach significantly less (Table 2) often the hidden platform than controls ($t = 2.67$, $df = 19$; $p < 0.05$).

In the probe test, pups of the two groups spent the same time in the quadrants where the target platform was ($t = 0.13$, $df = 19$; $p > 0.05$) but stressed pups avoided significantly less often the opposite quadrant compared to controls ($t = -3.54$, $df = 19$; $p < 0.005$).

There is no difference in time needed to find the visible platform in the “cued” test (data not shown).

3.2.4. Anhedonia test

An ANOVA (four Groups x Days of testing) with repeated measures on the second factor showed a significant Group effect ($F_{(3,20)} = 6.85$, $p < 0.005$) and interaction effect ($F_{(6,40)} = 4.68$; $p < 0.001$). A post hoc comparison showed that all females drunk significantly more sucrose solution than tap water; stressed females drunk significantly more sucrose solution at days 14 and 21 ($p < 0.05$); control females drunk significantly more sucrose solution only at day 21 ($p < 0.005$). The post hoc comparison also shows that there is no significant difference between control and stressed females for sucrose or tap water consumption (Fig.7).

4. Discussion

Even though some authors have reported cognitive and behavioral changes following acute stress during pregnancy (Darnaudery et al., 2004; Patin et al., 2002, 2004; Lordi et al., 2000, 1997; Vallée et al., 1997), one knows few things on the mediation of the chronic stress (mother/child) and the exact consequences on the pups' behavior.

We show in this study that chronic stress we used during the pregnancy can have dramatic consequences on dams and also offspring. We found that risk of miscarriages is doubled in stressed females. This would be due partly by the intensity of the stress induced or its chronicity. The intensity of the stress we used is relatively moderate as it

is indicated in methodology and would thus have low influences on the abortions. On the other hand, we think that the chronicity of this stress could induce abortions while interfering with the implantation of the blastocytes in the uterine mucous membrane about the sixth day of pregnancy. Our study does not make it possible to specify the exact moment when the abortions take place. One can specify they take place in first part of pregnancy that is before gestational day 10. In term of weight, we show that all pregnant females, stressed or control, have the same ponderal evolution letting suppose that after passed a critical period, female could present a pregnancy almost "normal ". We can also argue that only female "the least sensitive" to stressor leading forward their pregnancy. Moreover, the litter size is similar in all females letting suppose no partial abortion during the second part of the pregnancy. As in most of studies, there is interindividual vulnerability of stress (Habib et al., 2001) which could explain our contrasted results: lot of abortions in one side but offspring in health in other hand. Even if stressed female seems to have a "normal" pregnancy after the critical period, we show several significant cognitive and emotional impairments in pups born from these mothers. Pups alive at delivery, however, showed a similar weight to that of the control group. Moreover they did not show any differences in psychomotor tests at day 15. Theses markers of physical fitness were not contributing to the cognitive impairment we observed.

The chronic stress we used did neither induce depressive-like symptoms in the mothers (changes in sucrose intake or in weight) which could have influenced maternal behavior following the end of the stress period, that is after postnatal day 15 (PN15).

Pups born from stressed mothers displayed increased signs of trait anxiety at PN34 as shown by the dark box emergence test. We also found increased signs of state anxiety at PN15 using the open-field test but not at PN30. One possibility is that state anxiety in the pups at PN15 was a consequence of stress in the mother. The absence of state anxiety at PN34 on the elevated plus maze supports this possibility. Unfortunately, trait anxiety could not be tested at PN15 to verify whether or not it was present in the experimental pups. At the cognitive level we found habituation processes to be impaired at one month old (PN30 and PN34) as shown by results observed in the open-field and in the elevated-plus maze, respectively. Experimental pups still continue to explore actively their new environment when control pups have already memorized the principal cues of this environment. The possibilities that these results can be explained by hyperactive locomotor's patterns can be excluded because there were no group differences in locomotor's activity in the open-field test at PN30. We propose that this lack of habituation is due to impairment in short term memory compelling the animal to investigate much longer the environment.

The allocentric version of the water maze (MWM_{allo}) showed moderate cognitive deficits, such as less global success to reach the hidden platform and, in the probe test, less avoidance for the opposite quadrant. These results suggest that memory trace is less well consolidated in pups born from stress mothers compared to controls.

Cognitive deficits were more severe in alternate version (MWM_{alt}): animals born from stressed mothers needed more time, compared to controls, to find the hidden platform during the 6th day of the learning session, showing that they did not learn the

alternate procedure (see Fig.6C). Moreover, they have a similar number of successes compared to controls when they need to find hidden platform in the initial quadrant that is they are capable to learn the first position of the platform. When position of the platform is changed, experimental animal seems to be unable to adapt their behavior or trajectory in order to find to the alternate position of the platform. This lack of flexibility in their behavior was confirmed with the result in probe test where experimental rats spent more time in the initial quadrant. They persevere in the area where the platform was initially.

This behavior is similar to that of rats where prefrontal lobe was lesioned (Ethier et al., 2001) where adult rats are able to perform on the allocentric version (MWM_{allo}) but fail to find the second position of the hidden platform in the alternate version (MWM_{alt}). In fact, as for prefrontal lesioned rats, our experimental pups seem to have difficulties to select relevant cues to accurately detect the target (hidden platform). Experimental pups could have some difficulties using a strategy which necessitates adaptation from trial to trial due to their lack of behavioral flexibility or due to their short term memory deficits (Granon and Poucet, 1995).

In summary, the main findings of this research can be divided into transient and delayed effects of perinatal stress on behavior of pups. State anxiety is found to be transient impairment as it did not survive the cessation of the stressor at PN15. This impairment may have resulted directly from the stress of the mother. Stress could induce subtle changes in maternal behavior which in turn induce transient effects in pups (non genomic transmission of behavior (Weaver et al., 2004; Liu et al., 2000)).

However, there are impairments which continue or are delayed when the mother is no longer under the influence of the stress. Stress could also induce maturation deficit during fetal development which induce lasting cognitive deficits. After the end of the stressful stimulus there are two majors impairment. Firstly few problems emerge in the allocentric version of the water maze so it could be in relation to hippocampal deficiencies during maturation period of the brain (Morris et al., 1982) as it was already find with chronic stress (Vyas et al., 2003, 2002; Lupien et al., 1998). But, the more important deficits were observed in frontal-like tasks. In fact we have observed several problems in the alternate version of water maze, in trait anxiety and in habituation processes. So we suppose that frontal areas are more sensitive to moderate chronic stress during the brain maturation period. It could be hypothesis that perinatal stress disturbs synaptogenesis and brain programming (Seckl, 2004; Walker et al., 2004; Maccari et al., 2003; Vyas, 2002) in this area.

Since our study was conducted using barking dogs as a stressful stimulus we could have one confounding variables. In fact dogs are diurnal animals so they bark at day. On the other hand, rats are nocturnal animals so they sleep mainly on day. Thus we could think that females were submitted to two concomitant stresses that are sound and sleep deprivation (split sleep). In order to know the real impact of each kind of stresses we need to refine our analyses and tests the effects of sleep deprivation during pregnancy. One would need that so a follow-up study which thinks over the period of subjective day to the rat (at night) to avoid the problems of interruption of the sleep.

Figures

Fig.1. Ponderal evolution

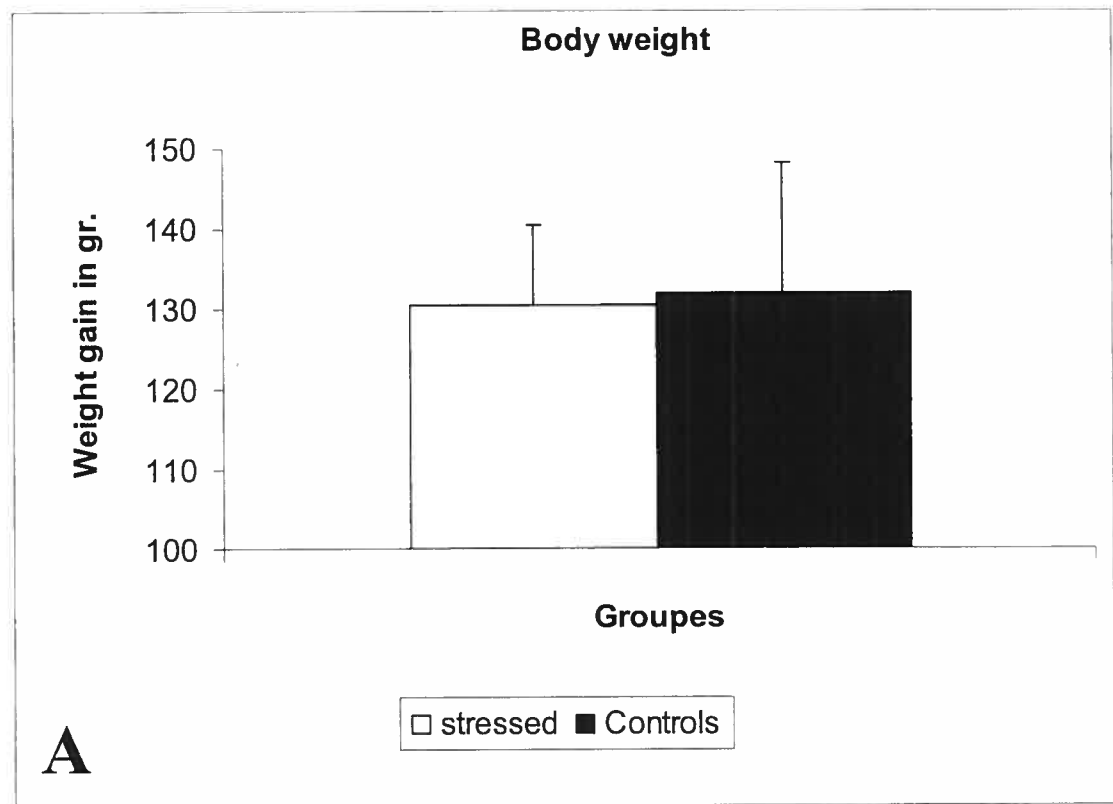


Fig.1A. Comparison of increase in body weight in control and stressed females. Each histogram indicates mean weight \pm SEM during the whole gestational period.

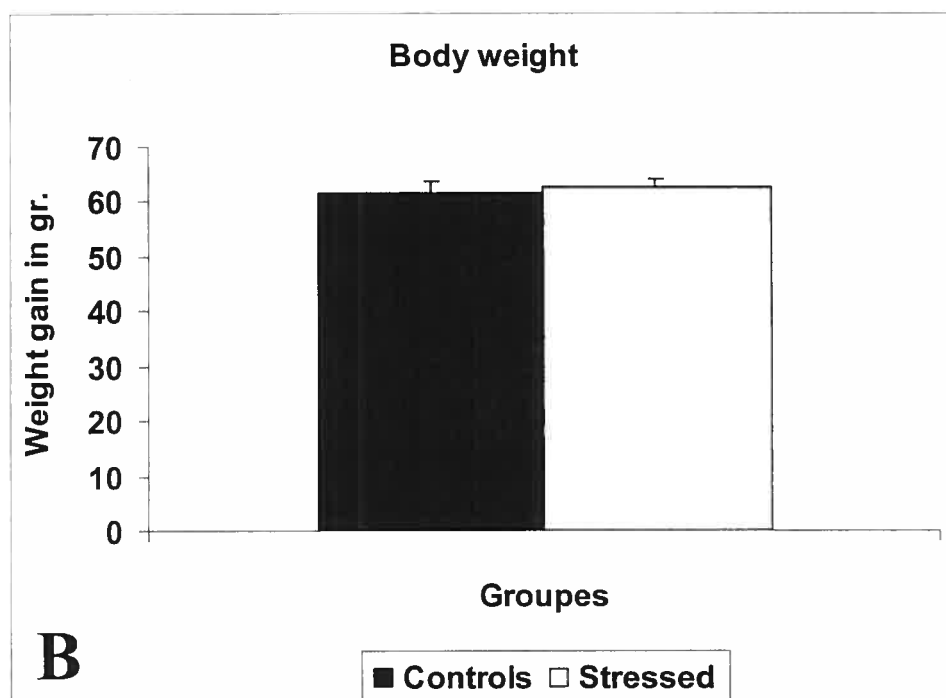


Fig.1B. Comparison of increase in body weight in control and experimental (stressed) pups during the twenty five first days of life. Each symbol indicates mean weight \pm SEM.

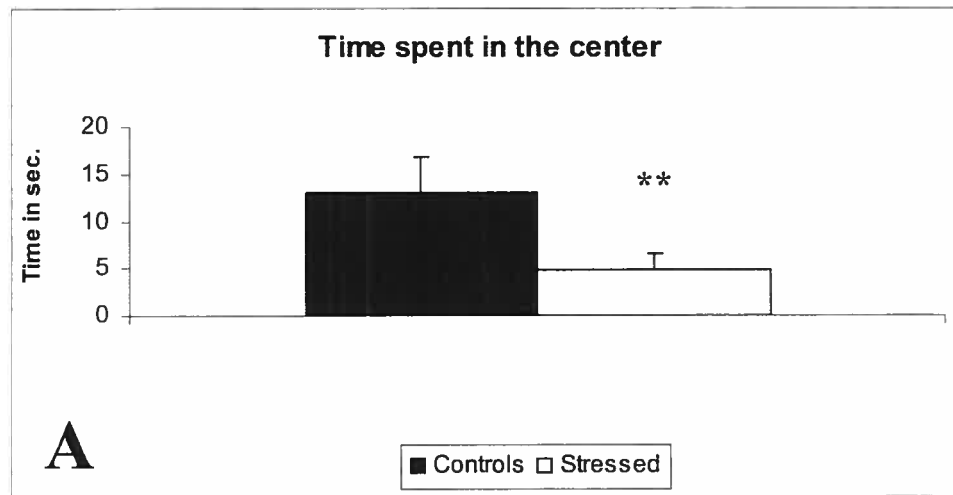
Fig.2. Open-field at PN15

Fig.2D. Comparison of time spent in the center of arena (**= $p < .005$) between control and experimental pups. Each histogram indicates mean time \pm SEM during the whole 15min period.

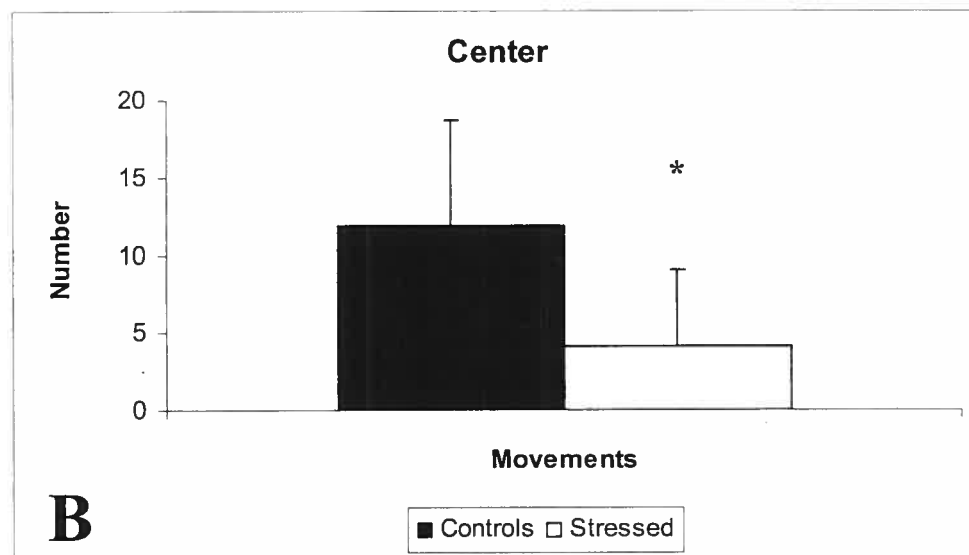


Fig.2B. Comparison of number of movements in the center of the arena (*= $p < .05$) between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the whole 15min period.

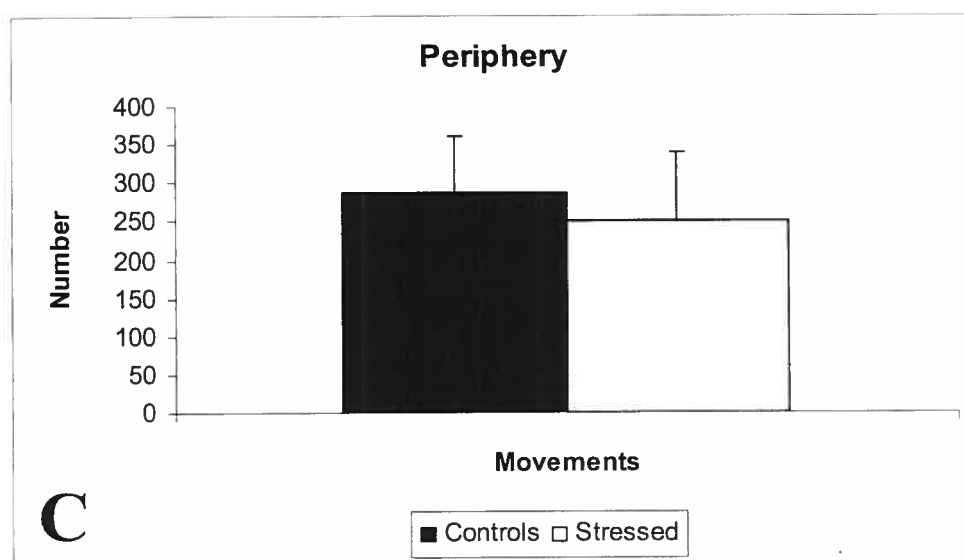


Fig.2A. Comparison of number of movements along the periphery of the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the whole 15min period.

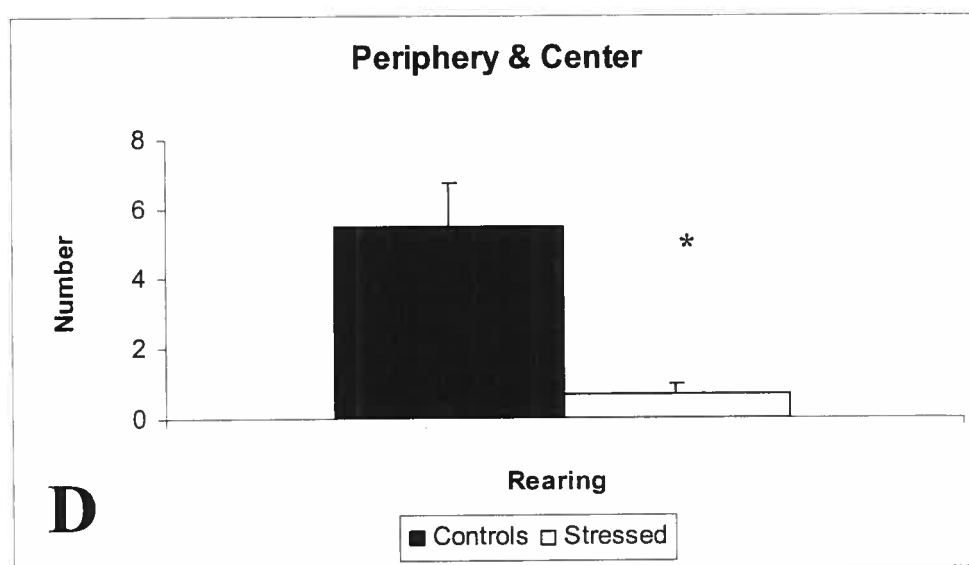


Fig.2C. Comparison of number rearing in the arena ($*=p<.05$) between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the whole 15min period.

Fig.3. Open-field at PN30 when data were broken down in three 5 minute periods

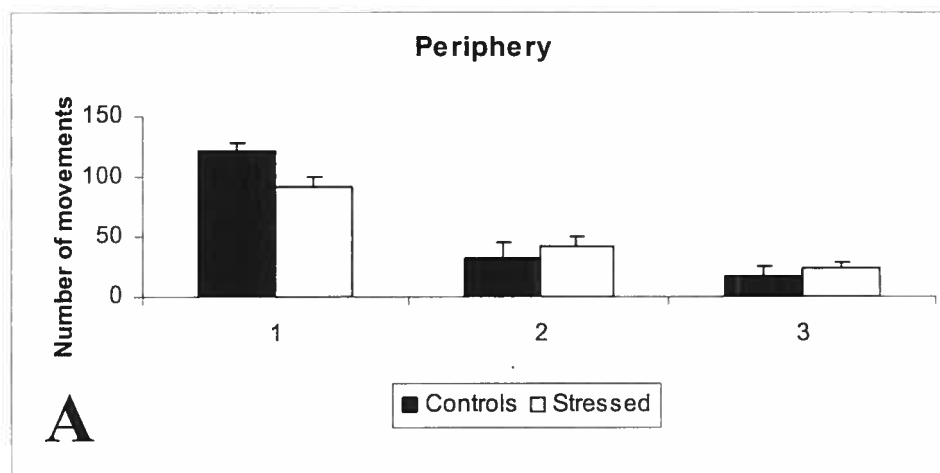


Fig.3A. Comparison of number of movements along the periphery of the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3).

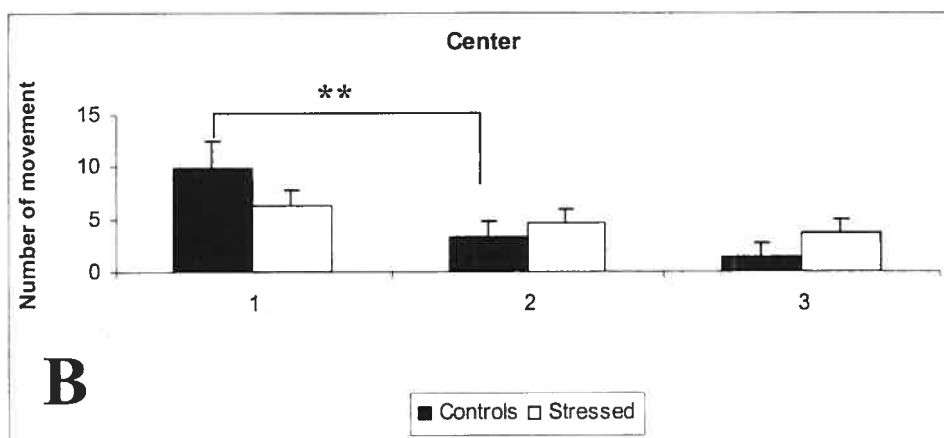


Fig.3B. Comparison of number of movements in the center of the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3). Difference was significant (**= $p < .005$) only for control group between first and second periods.

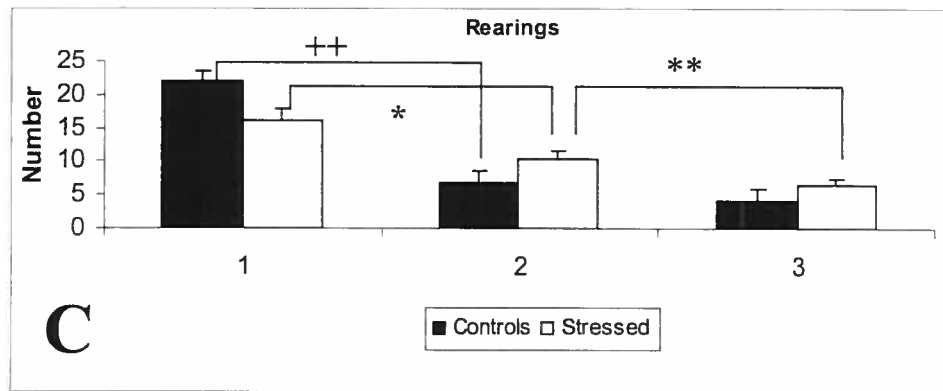


Fig.3C. Comparison of number of rearing in the arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean movements \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3). Difference was significant ($++=p<.001$) for control group only between first and second periods. Difference was also significant for experimental group ($*=p<.05$) between first and second periods and ($**=p<.005$) between second and third periods showing a deficit in habituation processes.

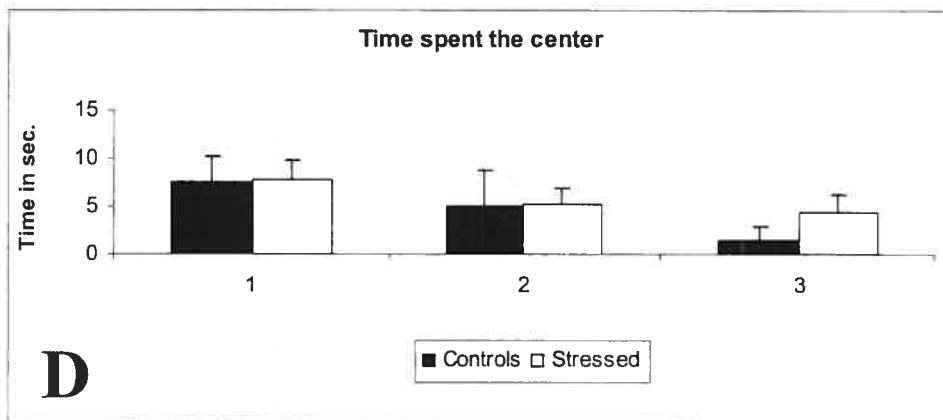


Fig.3D. Comparison of time spent in the center of arena between control and experimental pups. Each histogram indicates mean time \pm SEM during the three five-minute periods (1, 2, and 3).

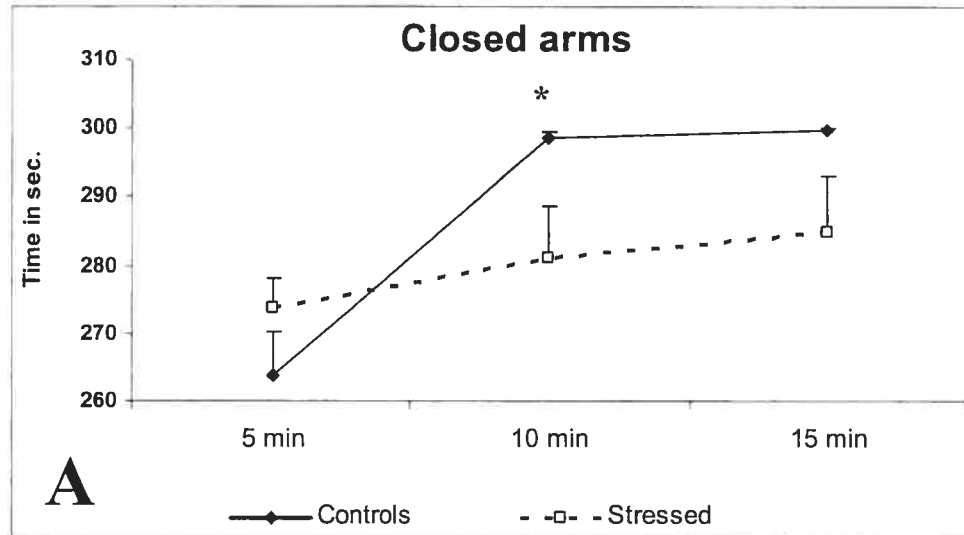
Fig.4. Elevated-Plus maze at PN34

Fig.4A. Comparison of time spent in the closed arms of the elevated-plus maze between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during the three five-minute periods (5, 10, and 15min). There was significant difference ($*=p<.05$) between the two groups for the second 10min period.

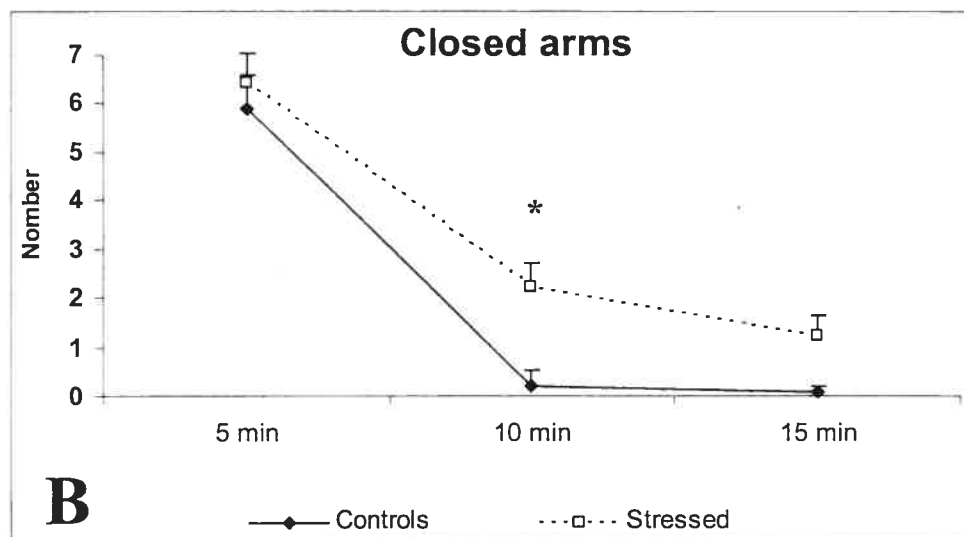


Fig.4B. Comparison of number of entries in the closed arms of the elevated-plus maze between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during

the three five-minute periods (5, 10, and 15min). There was also significant difference ($*=p<.05$) between the two groups for the second 10min period.

Fig.5. Dark Emergence Box at PN34

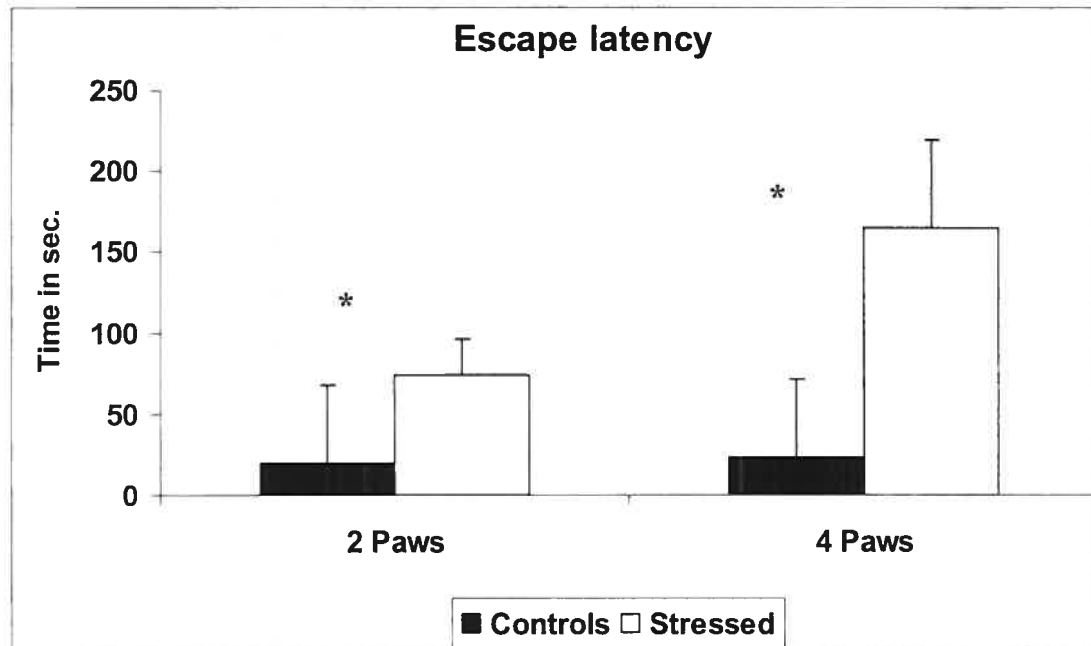


Fig.5. Comparison of time needed to escape with two and four paws from the dark box emergence test between control and experimental pups. Each histogram indicates mean time \pm SEM during the whole 10min period. There was significant difference ($*=p<.05$) between the two groups for the two paw criteria.

Fig.6. Spatial learning from PN21 until PN27

The allocentric version

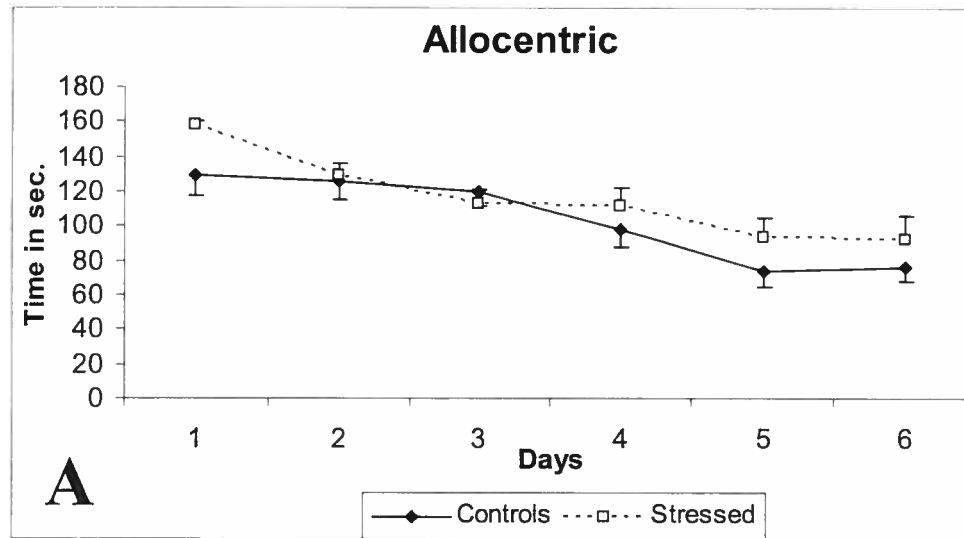


Fig.6A. Comparison of time needed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during the six days of the allocentric task.

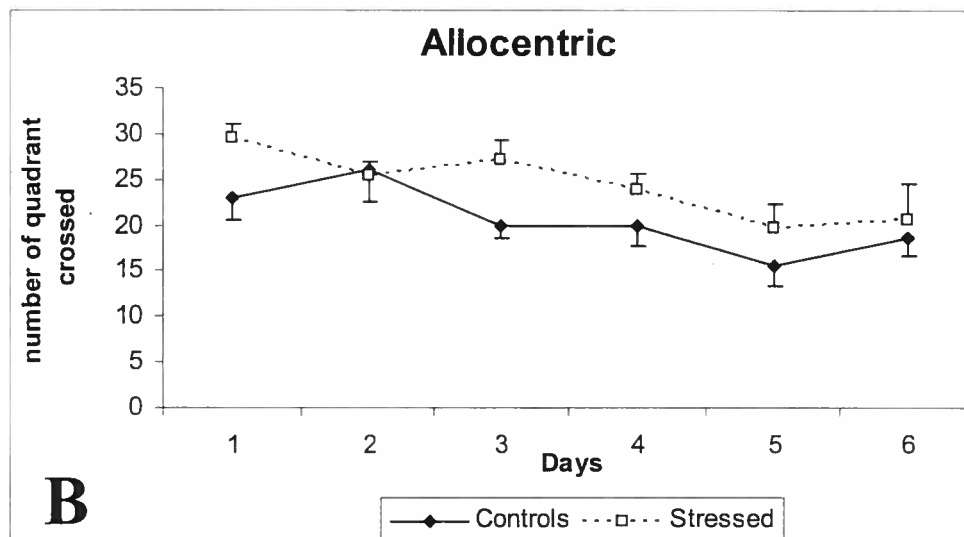


Fig.6B. Comparison of number of quadrants crossed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean number \pm SEM during the six days of the allocentric task.

The alternate version

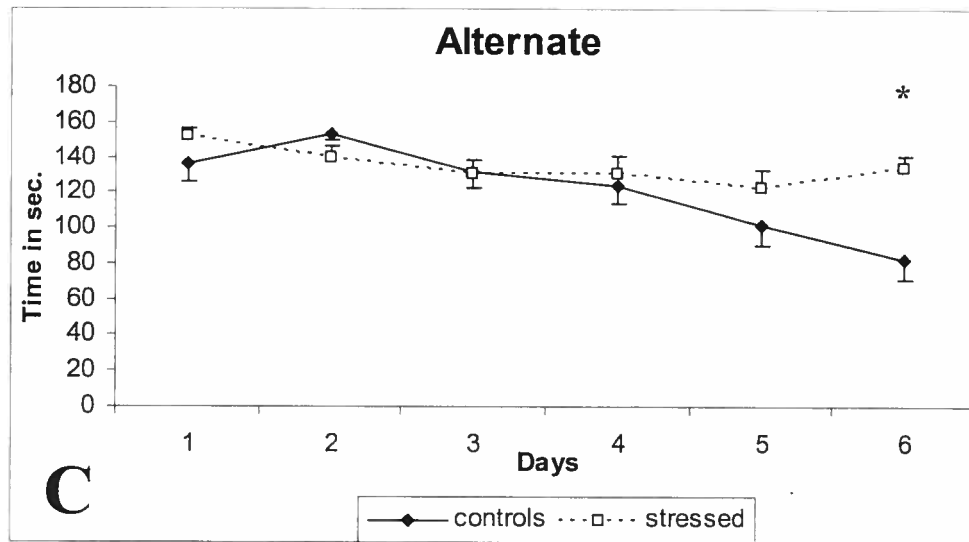


Fig.6C. Comparison of time needed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean time \pm SEM during the six days of the alternate task. There was significant difference (*= $p < .05$) between the two groups at day six of learning session.

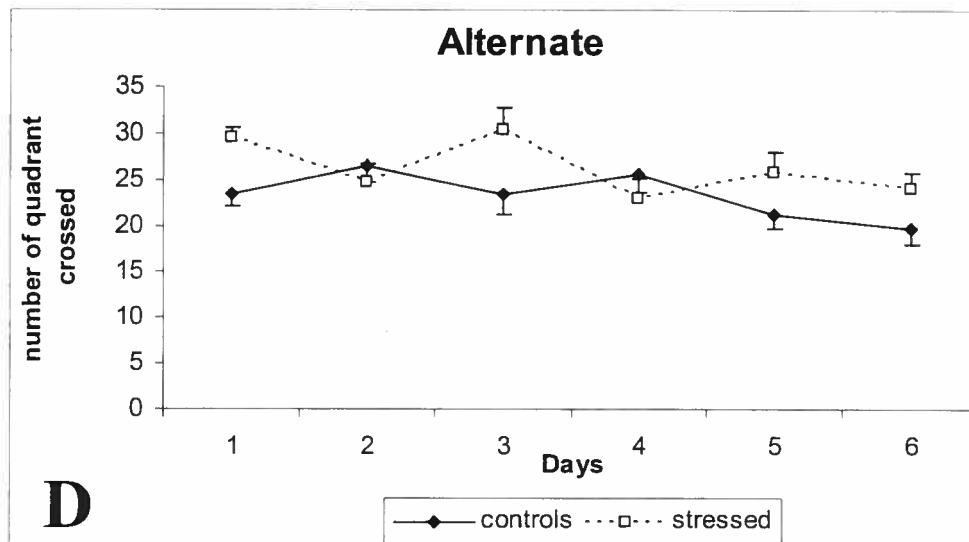


Fig.6D. Comparison of Number of quadrants crossed needed to reach the hidden platform between control and experimental pups. Each symbol indicates mean number \pm SEM during the six days of the alternate task.

Fig.7. Sucrose intake at gestational days 7, 14 and 21

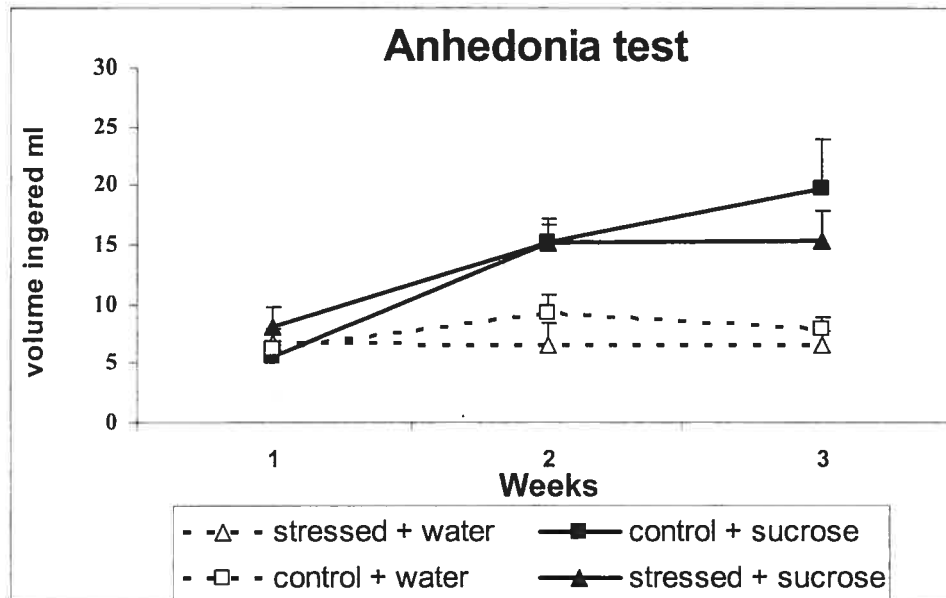


Fig.7. Comparison of sucrose solution and tap water intake between control and stressed mothers at gestational days 7th, 14th and 21st. Each symbol indicates the mean volume \pm SEM drunk by each group.

Tables

Table 1: Number of success for two successive attempts.

Allocentric version		
Pups	Controls	Stressed
Values	14.5 ± 0.92	11.0 ± 0.92

Table 2: Number of attempts before two successive successes.

Alternate version		
Pups	Controls	Stressed
Values	10.3 ± 1.53	16.6 ± 2.16

Acknowledgements

We are grateful to Pierre Fortier, Louis Chiochio and Caroline Bouchard for their technical assistance. This project was supported by the Banting Foundation and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

- 1 Amat J, Matus-Amat P, Watking LR, Maier SF. Ecapable and inescapable stress differntially alter extracellular level of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. Brain Res. 1998; 812(1-2): 113-120.
- 2 Antonio MT and Leret ML. Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low-level lead exposure. Life Sci. 2000; 67(6): 635-642.
- 3 Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. J Endocrinol 1999; 160:1-12.
- 4 Arnsten A. Stress impairs prefrontal cortical function in rats and monkeys: role of dopamine D1 and norepinephrine alpha-1 receptor mechanisms. Prog Brain Res 2000; 126: 183-192.
- 5 Bakshi VP, Kalin NH. Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions. Biol Psychiatry 2000; 48:1175-1198.

- 6 Beaulieu I and Godbout R. Spatial learning on the Morris Water Maze Test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat. *Brain Cognition* 2000; 43(1-3):27-31.
- 7 Brush FR. The Syracuse strains, selectively bred for differences in active avoidance learning, may be models of genetic differences in trait and state anxiety. *Stress* 2003a; 6(2): 77-85.
- 8 Brush FR Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. *Behav Genet.* 2003b; 33(6): 677-96.
- 9 Coll-Andreu M, Ayora-Mascarell L, Trullas-Oliva R, Morgado-Bernal I. Behavioral evaluation of the stress induced by the platform method for short-term paradoxical sleep deprivation in rats. *Brain Res. Bull.* 1989; 22(5): 825-828.
- 10 Creel S, Fox JE, Hardy A, Sands J, Garrott B, Peterson RO. Snowmobile activity and glucocorticoid stress responses in wolves and elk. *Conservation Biol.* 2002; 16(3): 809-814.

- 11 Darnaudery M, Dutriez I, Viltart O, Morley-Fletcher S, Maccari S. Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam rat. *Behav Brain Res.* 2004; 153(1): 211-6
- 12 Datta S, Patterson E, Vincitore M, Tonkiss J, Morgane PJ, Galler JR. Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. *J. Sleep Res.* 2000; 9: 71-79.
- 13 D'Hooge R and De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 2001; 36: 60-90.
- 14 Dilts RP and Boadle-Biber MC. Differential activation of the 5-hydroxytryptamine-containing neurons of the midbrain raphe of the rat in response to randomly presented inescapable sound. *Neurosci Lett.* 1995; 199(1): 78-80.
- 15 Endo Y, Nishimura JI, Kobayashi S, kimura F. Chronic stress exposure influences local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Neuroscience* 1999; 93(2): 551-555.

- 16 Ethier K, Le Marec N, Rompre PP, Godbout R. Spatial strategy elaboration in egocentric and allocentric tasks following medial prefrontal cortex lesions in the rat. *Brain Cognition* 2001; 46(1-2): 134-5.
- 17 Evans GW, Hygge S, Bullinger M. Chronic noise and psychological stress. *Psychol. Sci.* 1995; 6(6): 333-338.
- 18 Evans GW, Lercher P, Meis M, Ising H, Kofler WW Community noise exposure and stress in children. *J Acoust Soc Am.* 2001;109(3): 1023-1027.
- 19 File SE and Fernandes C. Noise stress and the development of benzodiazepine dependence in the rat. *Anxiety* 1994; 1(1): 8-12.
- 20 Granon S and Poucet B. Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. *Behav Neurosci.* 1995;109(3): 474-484.
- 21 Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30(3): 695-728.

- 22 Harkin A, Connor TJ, O'Donnell JM, Kelly JP. Physiological and behavioral responses to stress: what does a rat find stressful? *Lab Anim (NY)* 2002; 31(4): 42-50.
- 23 Holsboer F. The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res* 1999; 33:181-214.
- 24 Kay G, Tarcic N, Poltyrev T, Weinstock M. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol Behav.* 1998; 63(3): 397-402.
- 25 Kennaway DJ. Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(9): 398-402.
- 26 Koelh M, Darmaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both genders. *J. Neurobiol.* 1999; 40(3): 302-315.
- 27 Le Marec N, Ethier K, Rompré PP, R Godbout. Involvement of the medial prefrontal cortex in two alternation tasks using different environments. *Brain Cognition* 2002; 48(2-3): 432-6.

- 28 Leret ML, Millan JA, Antonio MT. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicol.* 2003; 186(1-2): 125-130.
- 29 Lieben CKJ, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res* 2004; 151: 53-64.
- 30 Liu D, Diorio J, Day DC, Francis DD, Meaney M. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neurosci.* 2000; 3: 799-806.
- 31 Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997; 277(5332): 1659-1662.
- 32 Lordi B, Patin V, Protais P, Melleir D, Caston J. Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring, *Int. J. Psychophysiol.* 2000; 37(2): 195-205.

- 33 Lordi B, Protais P, Mellier D, Caston J. Acute stress in pregnant rats: effects on growth rate, learning, and memory capabilities of the offspring. *Physiol. Behav.* 1997; 62(5): 1087-92.
- 34 Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Covit A, Tarshish C, Nair NPV, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neurosci.* 1998; 1: 69-73.
- 35 Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 2003; 27(1-2): 119-127.
- 36 Matsui T, Stansfeld S, Haines M, Head J. Children's cognition and aircraft noise exposure at home - the West London Schools Study. *Noise Health.* 2004 7(25): 49-58.
- 37 McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000; 886(1-2): 172-189.

- 38 McEwen BS and RM Sapolsky. Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995; 5: 205-216.
- 39 McMillen BA, Means LW, Matthews JN. Comparison of the alcohol-preferring P rat to the wistar rat in behavioral tests of impulsivity and anxiety. *Physiol Behav* 1998; 63(3): 371-375.
- 40 Morris RG. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 1984; 11: 47-60.
- 41 Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297(5868): 681-683.
- 42 Morrow BA, Redmond AJ, Roth RH, Elsworth JD. The predator odor, TMT, display a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Res.* 2000; 864(1): 146-151.
- 43 Palma BD, Suchecki D, Tufik S. Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain Res.* 2000; 861: 97-104.

- 44 Patin V, Lordi B, Vincent A, Thoumas JL, Vaudry H, Caston J. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Dev. Brain Res.* 2002; 139: 1-8.
- 45 Patin V, Vincent A, Lordi B, Caston J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Dev. Brain Res.* 2004; 149: 85-92.
- 46 Plotsky PM. Pathways to the secretion of adrenocorticotropin: a view from the portal. *J. Neuroendocrinol.* 1991; 3: 1-9.
- 47 Poltyrev T and Weinstock M. Gender difference in the prevention of hyperanxiety in adult prenatally stressed rats by chronic treatment with amitriptyline. *Psychopharmacol.* 2004; 171(3): 270-276.
- 48 Rondi-Reig L, Lemaigre Dubreuil Y, Martinou JC, Delhay-Bouchaud N, Caston J, Mariani J. Fear decrease in transgenic mice overexpressing bcl-2 in neurons. *Neuroreport* 1997; 8(11): 2429-2432.
- 49 Russell JA and Brunton PJ. Neuroactive steroids attenuate oxytocin stress responses in late pregnancy. *Neuroscience.* 2005. In press.

- 50 Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long term programming. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: U49-62.
- 51 Tanaka M. Emotional stress and characteristics of brain noradrenaline release in the rat. *Ind Health* 1999; 37(2): 143-156.
- 52 Thierry A, Tassin J, Blanc G, Glowinski J. Selective activation of mesocortical DA system by stress. *Nature* 1976; 263(5574): 242-244.
- 53 Valentino RJ, Curtis AL, Page ME, Pavlovich LA, Florin-Lechner SM. Activation of the locus coeruleus brain noradrenergic system during stress: circuitry, consequences, and regulation. *Adv. Pharmacol.* 1998; 42: 781-784.
- 54 Vallée M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 1997; 17(7): 2626-36.
- 55 Vyas A, Bernal S, Chattarji S. Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res* 2003; 965: 290-294.

- 56 Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 2002; 22(15): 6810-6818.
- 57 Walker CD, Deschamps S, Proulx K, Tu M, Salzman C, Woodside B, Lupien S, Gallo-Payet N, Richard D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *J Psychiat. Neurosci* 2004; 29(5): 364-382.
- 58 Wartella J, Amory E, Abbe AH, Macbeth H, McNamara I, Stevens L, Kelly KG, Lambert G, Kinsley CH. Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. *Physiol Behav* 2003; 79: 373-381.
- 59 Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neurosci.* 2004; 7(8): 847-854.

- 60 Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res* 1992; 595(2): 195-200.
- 61 Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. 2001; *Prog. Neurobiol.* 65: 427-461.
- 62 Witschi E. Development of vertebrates. 1956; Saunders, Philadelphia.

III. Discussion

Dans ce mémoire nous avons utilisé un modèle animal de stress périnatal chez les femelles gestantes afin d'évaluer ses conséquences sur le comportement anxieux de la progéniture, particulièrement sur la possibilité de l'apparition de signes d'anxiété. Si les déficits cognitifs consécutifs au stress chronique sont relativement bien évalués à l'âge adulte (Moreau et al., 1995; Moreau, 1997; Willner, 1997, Pardon et al., 2000), peu d'études se sont intéressées chez les petits. Dans ce mémoire nous avons tenu compte des deux périodes à risque (prénatale et postnatale). La présente étude montre qu'un stimulus périnatal stressant tel que les aboiements canins induit des comportements anxieux et des troubles d'apprentissage.

Le test en champ ouvert est basée sur la locomotion et l'exploration (Finn et al., 2003; Thullier et al., 2002) et non sur une composante visuelle. Les résultats sur l'évaluation de l'anxiété d'état par le test en champ ouvert, montrent que les petits issus de mères stressées présentent un comportement pathologique à PN15 (deux semaines) mais pas à PN30 (un mois). L'anxiété d'état transitoire pourrait s'expliquer par le fait que les petits et leur mères sont sous l'influence de l'agent stressant jusqu'au jour 15 de vie postnatale. Ce patron n'est pas inhabituel puisqu'il a été décrit dans d'autres modèles pathologiques (Fish, 2004). Or rappelons que l'audition chez le rat se développe tardivement et que les ratons ne sont pas directement sensibles au son avant PN12-PN14 (Sharp et LaRegina, 1998). Il est donc possible que le comportement maternel pendant

cette période ait pu influencer les résultats obtenus. En effet, nos résultats montrent de l'anxiété d'état à PN15 (deux semaines) mais non à PN30 (un mois).

Le test au labyrinthe en croix surélevé administré à PN34 (un mois) n'a pas montré de perturbation en ce qui concerne l'anxiété d'état chez les rats nés de mères stressées comparés aux rats témoins, contrairement à ce que nous avions prévu. Ce qui invalide en partie l'hypothèse spécifique 1. Cependant, les résultats ci-dessus portaient sur toute la durée du test, soit 15 minutes. Une analyse plus détaillée de ce test par période de 5 minutes n'a pas montré d'anxiété d'état, mais plutôt un défaut dans le processus d'habituation à l'environnement. Nous interprétons cette altération de la mise en place de l'habituation comme un déficit de la mémoire à court terme (mémoire de travail). En effet, nous avons montré que les rats issus de mères stressées explorent plus longtemps leur environnement à la recherche d'indices et sont plus lents à élaborer une stratégie d'habituation.

Par ailleurs, nous avons observé une anxiété de trait élevée au test d'émergence administré à PN34 soit un mois après la naissance. Malheureusement, nous n'avons pas évalué l'anxiété de trait à PN15 car le test d'émergence implique une perception du contraste lumière/obscurité, lequel n'est pas encore présent à cet âge (Sharp et LaRegina, 1998). Nos résultats montrent que les rats issus de mères stressées mettent significativement plus de temps pour sortir de la boîte d'émergence indiquant une augmentation du niveau de l'anxiété.

Aussi bien pour le labyrinthe en croix que pour l'émergence, il n'est pas possible de tester les rats à PN15 (deux semaines) compte tenu du fait que tous les animaux n'ont pas les yeux ouverts : il est impossible pour ces rats d'explorer les branches ouvertes sur le vide du labyrinthe en croix ou de percevoir le contraste lumière/obscurité à l'émergence. Il est par contre possible de tester les rats à PN15 au test en champ ouvert car il est basé sur la locomotion et la capacité de l'animal à explorer son environnement (Finn et al., 2003; Thullier et al., 2002) et non pas essentiellement sur la vision. Il faudrait donc compléter cette recherche avec un test d'anxiété de trait adapté à PN15.

Les résultats à la piscine allocentrique de Morris montre des déficits modérés chez les rats issus de mères stressées mais pas de troubles moteurs. Le temps lors des essais réussis est similaire dans les deux groupes de rats. Ceci montre que leur capacité de nager n'est pas altérée et qu'il s'agit bien d'un déficit cognitif. Au test de réminiscence ("probe test"), les rats issus de mères stressées évitent significativement moins le quadrant opposé que les rats témoins, suggérant que la trace mnésique est moins bien consolidée. Les indices mémorisés ne semblent pas permettre un évitement efficace de la zone opposée à la zone cible (emplacement de la plateforme) et donc ne permettent pas aux rats de se focaliser sur la cible. Parmi les possibilités qui expliquent ces résultats, nous retenons les deux suivantes : 1) un ralentissement des processus d'apprentissage de sorte qu'une septième ou huitième journée de test aurait

été nécessaire; 2) un retard maturationnelle de sorte qu'un test à un âge plus avancé aurait été normal.

Il faudrait donc compléter cette recherche en testant les animaux régulièrement pendant l'ontogenèse afin de vérifier un éventuel retard dans la maturation ou procéder à des euthanasies de PN1 à PN30 afin d'étudier le développement des hippocampes ainsi que la synaptogenèse.

Dans l'autre version du test, lorsque la plateforme alterne entre deux positions, les déficits cognitifs sont plus sévères. La tâche devient plus complexe pour les animaux et demande plus de flexibilité cognitive et sollicite l'intervention efficace des lobes frontaux afin d'élaborer une règle d'alternance (Éthier et al., 2001). On constate que les rats issus de mères stressées ont besoin de plus de temps que les rats témoins pour apprendre le principe d'alternance et, au jour 6, la différence entre les deux groupes est significative. Ils apprennent aussi bien que les rats témoins la position initiale de la plateforme, montrant une fois de plus que leur aptitude à nager n'est pas altérée. Mais lorsque celle-ci change de position, les rats expérimentaux sont moins aptes à élaborer une stratégie de réajustement de leur trajectoire (manque de flexibilité comportementale) pour retrouver la plateforme. Il serait donc possible que les rats issus de mères stressées aient des difficultés à organiser plusieurs informations (règle d'alternance) en mémoire de travail. Au test de réminiscence, on constate que les rats des deux groupes passent le même temps dans le quadrant de la position initiale où la plateforme se situait.

Cependant, les rats issus de mères stressées restent moins longtemps dans le quadrant de la position alternée, leur stratégie est donc plus diffuse dans la recherche de la plateforme dans sa position alternée. La mémorisation de la position de la plateforme alternée est nettement moins bien consolidée. Ceci pourrait suggérer encore une fois que les rats du groupe expérimental auraient un déficit de mémoire de travail, de la même façon que des animaux adultes ayant subi une lésion du cortex préfrontal (Éthier et al., 2001) : ceux-ci performant bien dans la version allocentrique de la piscine de Morris, mais ont plus d'échecs lorsque la plateforme alterne entre deux positions comparativement à un groupe contrôle (Éthier et al., 2001, Beaulieu et Godbout, 2000).

Les déficits liés à l'apprentissage et à la mémorisation dans les labyrinthes aquatiques confirment que les déficits observés au labyrinthe en croix sont dus à un problème d'apprentissage d'habituation plutôt qu'à un comportement anxieux lui-même. Il demeure qu'une des façons de tester cette interprétation serait d'administrer un anxiolytique de la classe des benzodiazépines (Millan, 2003) comme par exemple le diazepam.

Contrairement à ce qui était prévisible selon la littérature (Rudrauf et al., 2004; Lepicard et al., 2003; Chapouthier et Venault, 2002), les capacités psychomotrices des rats issus de mères stressées ne sont pas altérées dans notre étude, ce qui invalide l'hypothèse 3. Avec le fait que les autres paramètres de santé comme par exemple le

poids corporel sont normaux, on peut croire que les rats du groupe expérimental sont dans un bon état de santé global.

Interprétation

Nous avons brièvement évoqué plus haut quelques pistes d'interprétations. Dans les paragraphes suivants, nous allons les analyser de façon plus systématique.

- 1) un problème de maturation des structures nerveuses ou de synaptogenèse lors du stade fœtal;
- 2) un problème de maturation du système nerveux central lors des deux premières semaines de vie postnatale;
- 3) une influence directe du stimulus sur le niveau de stress des petits;
- 4) un comportement maternel altéré.

1. Perturbations in utéro au stade gestationnel

Plusieurs études ont montré que le fœtus est sensible aux perturbations subies par la mère au cours de la gestation (DeSesso et al., 1998; Holemans et al., 1998; Dominguez et al., 1996; Navarro et al., 1995). De plus l'induction d'un stress chronique pendant la gestation entraîne une augmentation des niveaux des hormones de stress plus particulièrement les glucocorticoïdes chez la femelle gestante, ce qui pourrait altérer le développement neuroendocrinien et émotionnel de la progéniture (Neumann et al.,

1998). L'augmentation chronique des niveaux de glucocorticoïdes circulants chez la femelle gestante pourrait en fait suractiver l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS) de celle-ci. Puisque les glucocorticoïdes traversent aisément la barrière fœto-placentaire, ils pourraient se retrouver dans le sang fœtal et ainsi interférer avec le développement optimal du système nerveux central en particulier le système limbique et l'axe HHS du fœtus (Neumann et al., 1998). Sur le plan physiologique, on pense que les rats issus de mères stressées souffriraient d'un déséquilibre primaire de l'axe HHS acquis de façon permanente in utero durant la gestation (Levine, 2002) via les glucocorticoïdes. Sur le plan comportemental, ce déséquilibre pourrait entraîner une modification du comportement des petits notamment une incapacité à réagir de façon adéquate au stress (Fameli et al. 1994).

L'exposition chronique périnatal à des agents stressants auxquels l'animal ne peut se soustraire comme dans la présente étude peut entraîner une persistance de l'élévation de la corticostérone plasmatique (Creel et al., 2002; Brennan et al., 2000). Les déficits comportementaux des rats observés ici pourraient s'expliquer par la transmission des facteurs endocriniens pathologiques de la mère au fœtus via les échanges sanguins mère/fœtus (Weinstock, 2005). De plus, il a été montré que le facteur de libération de la corticotropine (CRF) est un neuropeptide trouvé partout dans le système nerveux central et qui a un rôle dans la modulation des états émotionnels et comportementaux, incluant le stress et l'anxiété. L'amygdale, qui est importante dans le contrôle des réponses émotionnelles et autonomes, contient des neurones dont les boutons terminaux, les corps

cellulaires contiennent du CRF et des récepteurs au CRF (Caldji et al., 2003; 1998). Chez les rats, l'exposition au stress prénatal (donc augmentation des glucocorticoïdes fœtaux) induit un état hyperémotionnel et une anxiété élevée chez les petits (Cratty et al., 1995). Par ailleurs Sandi (1998) a suggéré que la libération des hormones du stress par les glandes surrénales a une conséquence directe influençant la formation de la mémoire. La baisse ou l'excès des niveaux de ces hormones particulièrement dans le stress chronique altèrent aussi bien l'acquisition que le rappel de l'information spatiale.

Donc, l'application d'un stress périnatal peut prédisposer les ratons à des perturbations importantes tant sur le plan de l'anxiété que sur le plan cognitif par le biais d'un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien.

2. Problèmes de maturation durant les deux premières semaines de vie des petits

Les études de Kolb (1990) ont montré que le développement des structures du lobe frontal pendant les deux premières semaines de vie postnatale est important pour acquérir les capacités à modifier le comportement en réponse aux indices environnementaux ainsi que pour la mémoire de travail (Zhang, 2004; Nair et al., 2001). Nair et collaborateurs (2001) ont montré qu'il n'y a pas de réajustement possible du comportement à PN12 mais que ce type de comportement se met en place graduellement à partir de PN17. De ce fait, toute perturbation survenant durant cette période est susceptible d'altérer la flexibilité comportementale et la mise en place des mécanismes

de la mémoire de travail des rats. Cependant, il est possible qu'un déficit dans les processus de maturation ne débute pas à ce moment précis du développement. En effet, la maturation du système nerveux central est un phénomène progressif qui commence depuis le stade embryonnaire et se poursuit longtemps après la naissance. Donc les déficits discutés plus haut pourraient continuer à s'accroître au cours de la vie. Si ces déficits proviennent essentiellement d'une altération in utero, alors ils pourraient être dus à une modification structurale. Tandis que s'ils surviennent pendant la maturation durant la période postnatale, il est possible qu'il y ait un retard maturationnel. Pour ce faire, il faudrait tester les animaux à l'âge adulte pour savoir si les déficits sont temporaires ou permanents.

3. Perturbation par influence directe du stimulus sur le niveau de stress des petits

L'audition n'apparaît chez le raton qu'à partir de PN12 à PN14 (Sharp et LaRegina, 1998). Il s'avère donc que l'agent stressant n'aurait pu agir directement sur les rats qu'à partir de cet âge; or nous observons des déficits dès PN15. Par ailleurs, des études ont montré que le raton se trouve dans une période réfractaire au stress durant les deux premières semaines de vie (Liu et al., 1997; De Kloet et al., 1988; Henning, 1978), pendant laquelle la réactivité au stress par le raton est très faible (Levine, 2002). L'impact direct du stressor sur les rats semble donc peu probable. Cette recherche pourrait donc être complétée par des tests sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien et le dosage de la corticostérone plasmatique chez les petits.

4. Perturbation par modification du comportement maternel

Il est possible que les femelles soumises au stress aient montré une altération de leur comportement maternel, ce qui pourrait entraîner un déficit dans les soins prodigués aux ratons. Or, il a été montré que des déficiences dans les soins apportés aux petits ont une influence sur le développement cognitif des ratons notamment dans les tests d'orientation spatiale comme le test de la piscine allocentrique de Morris (Liu et al., 2000; Francis et Meaney, 1999). Nous n'avons que peu de déficits dans ce test, donc on peut supposer que l'incidence du comportement maternel ne serait pas un facteur primordial pour expliquer les déficits observés. Par contre, contrairement à notre étude, l'équipe de Meaney n'a pas utilisé de tests de flexibilité cognitive comme notre test d'alternance et il se pourrait que des comportements maternels déficitaires puissent être associés à des troubles cognitifs plus subtiles comme ceux démontrés dans ce mémoire avec un stimulus peut être plus modéré que la contention.

Par ailleurs, il est possible que le stimulus utilisé dans ce mémoire soit considéré comme un stress chronique et modéré. Il est chronique compte tenu de sa durée (plus d'un mois). Il est modéré parce que :

- Le taux de décibels est inférieur aux normes préconisées dans les animaleries (80dB) par le Conseil Canadien Pour la Protection des Animaux (CCPA).
- On sait par ailleurs que différents traitements expérimentaux (prise d'alcool, administration de médicaments, modification dans l'alimentation, les

infections, le stress) imposés à la mère durant la gestation sont susceptibles d'induire un comportement dépressif (DeSesso et al., 1998; Holemans et al., 1998; Dominguez et al., 1996; Navarro et al., 1995). On pourrait donc croire que c'est cet effet comportemental chez la mère qui serait responsable des troubles observés chez la progéniture. Dans la présente étude, les mesures standards que nous avons prises chez les mères pendant plus d'un mois à cet égard comme le sucrose, le poids (Grippe, 2003; Moreau, 1997; Willner, 1997) n'ont pas montré de différences entre le groupe stressé et le groupe témoin. De plus, le gain de poids des femelles des deux groupes durant la gestation était similaire, ce qui conforte l'absence de syndrome dépressif.

- Contrairement aux études qui ont montré que le poids des ratons nés de mères stressées est inférieur à la naissance à celui des contrôles (Cabrera et al., 1999; Lordi et al., 1997) et que la proportion mâles/femelles est perturbée (Lordi et al., 2000), notre étude ne montre pas cet effet. En effet, le poids des petits à la naissance est similaire entre les deux groupes de ratons. De plus, le gain de poids corporel de la progéniture est semblable dans les deux groupes jusqu'au 25^{ème} jour de vie postnatale. De la même façon, la répartition des naissances mâles et des femelles dans les portées est similaire.

Nous notons par contre deux possibilités qui suggèrent que le stimulus n'est peut être pas si modéré.

- Le nombre d'avortements spontanés supposés est deux fois plus élevé chez les femelles soumises au stress comparées aux femelles témoins.
- L'application de notre stimulation stressante avait lieu le jour. Puisque les rats sont des animaux nocturnes, on pourrait penser que l'application du stimulus stressant a aussi induit des perturbations du sommeil chez les femelles gestantes stressées et pourraient expliquer, du moins en partie, les déficits comportementaux observés chez la progéniture (Dugovic et al., 1999; Moreau 1997). Par ailleurs, Rabat et collaborateurs (2005) ont montré qu'une exposition chronique à un bruit environnemental induit des perturbations de sommeil chez des rats en limitant les quantités de sommeil à ondes lentes et de sommeil paradoxal ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de ces deux stades.

IV. Conclusion

Plusieurs études chez l'animal montrent que les événements stressants périnataux pourraient influencer négativement le développement du fœtus et induire une augmentation du niveau d'anxiété. De plus, l'altération du comportement maternel chez les femelles stressées pourrait entraîner une augmentation du niveau d'anxiété et des déficits cognitifs chez la progéniture. Les résultats du présent mémoire montrent qu'un stress infligé à la femelle gestante durant la période périnatale a des conséquences comportementales non négligeables : d'une part sur les femelles gestantes avec deux fois plus d'avortements supposés, d'autre part sur le comportement émotionnel et cognitif de la progéniture. Les petits du groupe expérimental présentent une anxiété de trait élevée, des déficits cognitifs dans des tâches plus complexes et un défaut d'habituation à l'environnement.

Les limites de la présente étude laissent nombre d'interrogations auxquels nous n'avons pas pu répondre. Pour palier à ces limites, nous proposons de poursuivre l'étude afin d'évaluer les fondements neurobiologiques des déficits observés. Il serait possible, par exemple d'examiner des constituants du système limbique comme la densité et le nombre de récepteurs à benzodiazépines liés à l'anxiété, à sérotonine liés à l'humeur ainsi que la densité des contacts synaptiques corticaux liés à la maturation du système nerveux central et les récepteurs à CRH liés au stress (Racca et al., 2005; Millan, 2003; Van de Berg et al., 2000) tant chez les femelles gestantes que chez les petits. De plus

l'analyse du comportement maternel (Francis et Meaney, 1998; Lui et al., 1997) serait pris en compte. L'administration du stimulus stressant à des moments précis de la gestation (première ou deuxième moitié) ou durant les deux premières semaines de vie postnatale des petits ainsi qu'une analyse polysomnographique du sommeil des femelles au cours de la gestation et de la progéniture seraient considérées. Pour palier aux perturbations de sommeil induites par les aboiements canins, on pourrait les enregistrer et les diffuser durant la période d'activité des femelles (c'est-à-dire durant la phase d'obscurité).

Il y a encore beaucoup de travail à accomplir afin d'évaluer tous les mécanismes impliqués dans les conséquences du stress périnatal sur le comportement de la progéniture. Nous espérons que le présent mémoire saura apporter certains éclaircissements sur cette importante question.

V. Bibliographie

- 1) Agmo A, Belzung C, Deloire X, Grassin M and Lewis S. Blockade of anxiolytic-like actions of chlordiazepoxide by naloxone in the elevated plus-maze: Comparisons between SWISS, C57BL/6 and BALB/c mice. *Psychobiology* 1999; 27:105–113.
- 2) Amat J, Matus-Amat P, Watking LR and Maier SF. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular level of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Research* 1998; 812 (1-2), 113-120.
- 3) Barbanzanges A, Piazza PV, Le Moal M and Maccari S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci.* 1996; 16:3943–9.
- 4) Batuev AS, Vinogradova EP and Poliakova ON. The effect of stress in pregnant rats on the anxiety level in their offspring *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* 1996; 46(3):558-63.
- 5) Beaulieu I and Godbout R. Spatial learning on the Morris Water Maze Test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat. *Brain Cognition* 2000; 43(1-3): 27-31.
- 6) Belzung C, Pineau N, Beuzen A and Misslin R. PD135158, a CCK-B antagonist, reduces "state," but not "trait" anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 49(2):433-6.

- 7) Bernatova I and Csizmadiova Z. Effect of chronic social stress on nitric oxide synthesis and vascular function in rats with family history of hypertension. *Life Sci.* 2005. In press.
- 8) Beuzen A and Belzung C. Link between emotional memory and anxiety states: A study by principal component analysis. *Physiol. Behav.* 1995; 58:111–118.
- 9) Bilbo SD, Levkoff LH, Mahoney JH, Watkins LR, Rudy JW and Maier SF. Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. *Behav Neurosci.* 2005; 119(1):293-301.
- 10) Brennan FX, Ottenweller JE, Seifu Y, Zhu G and Servatius RJ. Persistent stress-induced elevations of urinary corticosterone in rats. *Physiol. Behav.* 2000; 71(5): 441-446.
- 11) Brown RW, Diaz R, Robson AC, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Kaufman MH and Seckl JR. The ontogeny of 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinol* 1996; 137: 794-797.
- 12) Cabrera RJ, Rodriguez-Echandia EL, Jatuff AS and Foscolo M. Effects of prenatal exposure to a mild chronic stress on body weight, preweaning mortality and rat behaviour. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999; 32(10): 1229-1237.

- 13) Caldji C, Diorio J and Meaney MJ. Variations in maternal care alter GABA(A) receptor subunit expression in brainregions associated with fear. *Neuropsychopharmacology*. 2003; 28(11):1950-9.
- 14) Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM and Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95(9):5335-40.
- 15) Caston J (1992). *Psychophysiologie*, Col. Ellipses. Tome I.
- 16) Chapouthier G and Venault P. GABA-A receptor complex and memory processes. *Curr Top Med Chem*. 2002; 2(8):841-51.
- 17) Clément Y, Martin B, Venault P and Chapouthier G. Involvement of regions 4th and 7th chromosomes in the open-field activity in mice. *Behav. Brain Res*. 1995; 70:51–57.
- 18) Clément Y, Calatayud F and Belzung C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain Res Bull*. 2002; 57(1):57-71.
- 19) Cole TJ. Cloning of the mouse 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene: tissue specif expression and localization in distal convoluted tubules and collecting ducts of the kidney. *Endocrinol*. 1995; 136: 4693-4696.
- 20) Coll-Andreu M, Ayora-Mascarell L, Trullas-Oliva R and Morgado-Bernal I. Behavioral evaluation of the stress induced by the platform

method for short-term paradoxical sleep deprivation in rats. *Brain Research Bulletin* 1989; 22(5), 825-828.

- 21) Cratty MS, Ward HE, Johnson EA, Azzaro AJ and Birkle DL. Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. *Brain Res.* 1995; 675(1-2):297-302.
- 22) Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A and Paylor R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: Implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 1997; 132: 107–124.
- 23) Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* 1999; 835(1):18-26.
- 24) Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav. Rev* 1985; 9:37–44.
- 25) Creel S, Fox JE, Hardy A, Sands J, Garrott B and Peterson RO. Snowmobile activity and glucocorticoid stress responses in wolves and elk. *Conservation Biol.* 2002; 16(3): 809-814.
- 26) Cruz APM, Frei F and Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 49(1):171–6.

- 27) Csaba G. Receptor ontogeny and hormonal imprinting. *Experientia* 1986; 42: 750-758.
- 28) Datta S, Patterson E, Vincitore M, Tonkiss J, Morgane PJ and Galler JR. Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. *J. Sleep Res.* 2000; 9: 71-79.
- 29) De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W and Levine S. Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res.* 1988; 73:101–120.
- 30) DeSesso JM, Jacobson CF, Scialli AR, Farr CH and Holson JF. An assesment of the developmental toxicity of inorganic arsenic, *Reproductive Toxicol.* 1998; 12(4):385-433.
- 31) Divac I, Wirkmark RGE and Gade A. Spontaneous alternation in rats with lesions in the frontal lobes: An extension of the frontal lobe syndrome. *Physiological Psychology* 1975; 3(1), 39–42.
- 32) Dominguez HD, Lopez MF, Chotro MG and Molina JC. Perinatal responsiveness to alcohol's chemosensory cues as a function of prenatal alcohol administration during gestational days 17-20 in the rat, *Neurobiol. Learning and Memory.* 1996; 65(2):103-112.
- 33) Doron R and Parot F. *Dictionnaire de psychologie.* Paris: Presses Universitaires de France; 1991.

- 34) Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW and Van Reeth O. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predicts persistent paradoxical sleep alterations. *J. Neurosci.* 1999; 19(19): 8656-8664.
- 35) Endo Y, Nishimura JI, Kobayashi S and Kimura F. Chronic stress exposure influences local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Neuroscience* 1999; 93(2), 551-555.
- 36) Ethier K, Le Marec N, Rompre PP and Godbout R. Spatial strategy elaboration in egocentric and allocentric tasks following medial prefrontal cortex lesions in the rat. *Brain Cogn* 2001; 46(1-2): 134-5.
- 37) Fameli M, Kitraki E and Stylianopoulou F. Effects of hyperactivity of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during pregnancy on the development of the HPA axis and brain monoamines of the offspring. *Int. J. Develop. Neurosci.* 1994; 12(7): 651-659.
- 38) File SE. The biological basis of anxiety. In: Meltzer HY and Nerozzi D eds. *Current practices and future developments in the pharmacotherapy of mental disorders.* Amsterdam: Elsevier, 1991; 159-165.
- 39) Finn DA, Rutledge-Gorman MT and Crabbe JC. Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics* 2003; 4(3):109-35. In press.
- 40) Fish EW, Shahrokh D, Bagot R, Caldji C, Bredy T, Szyf M and Meaney MJ. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1036:167-80.

- 41) Francis DD and Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Current Opinion in Neurobiol.* 1999; 9: 128-134.
- 42) Granon S, Vidal C, Thinus-Blanc C, Changeux JP and Poucet B. Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions, *Behavioral Neuroscience*, 1994; 108(5), 883–891.
- 43) Greenwood CE and Young SN. Dietary fat intake and the brain: a developing frontier in biological psychiatry. *J Psychiatry Neurosci* 2001; 26(3): 182-4.
- 44) Griebel G, Belzung C, Perrault G and Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology* 2000; 148:164–170.
- 45) Grippo AJ, Beltz TG and Johnson AK. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav.* 2003;78(4-5): 703-710.
- 46) Hall CS. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comp Physiol Psychol* 1936; 22:345–352.
- 47) Henderson ND. Prior treatments on open field behaviour in mice: a genetic analysis. *Animal Behav.* 1967; 15:376.
- 48) Henning SJ. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol.* 1978; 235:E451–E456.

- 49) Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M and Maccari S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol.* 1994; 6:341–5.
- 50) Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(1):21-30.
- 51) Holemans K, Aerts L and Van Asseche FA. Fetal growth and long-term consequences in animal models of growth retardation. *Eur. J. Obstetrics Gynecology and Reproductive Biol.* 1998; 81: 149-156.
- 52) Jedema HP, Finlay JM, Sved AF and Grace AA. Chronic cold exposure potentiates CRH-evoked increases in electrophysiologic activity of locus coeruleus neurons. *Biol Psychiatry* 2001; 49:351–359.
- 53) Jedema HP, Sved AF, Zigmond MJ and Finlay JM. Sensitization of norepinephrine release in medial prefrontal cortex: effect of different chronic stress protocols. *Brain Res.* 1999; 830:211–217.
- 54) Jett DA, Kuhlmann AC, Farmer SJ and Guilarte TR. Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 57(1-2):271-9.
- 55) Joyal CC, Strazielle C and Lalonde R. Effects of dentate nucleus lesions on spatial and postural sensorimotor learning in rats. *Behav Brain Res.* 2001; 122(2):131-7.

- 56) Joyal CC, Meyer C, Jacquart G, Mahler P, Caston J and Lalonde R. Effects of midline and lateral cerebellar lesions on motor coordination and spatial orientation. *Brain Res.* 1996; 739(1-2):1-11.
- 57) Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E and Brady DL. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2005; 156(2):251-61.
- 58) Kolb B. Prefrontal cortex. The cerebral cortex of the rat. B Kolb and RC Tees, Cambridge, MA: MIT Press: 437-58 (1990).
- 59) Le Marec N, Ethier K, Rompre PP and Godbout R. Involvement of the medial prefrontal cortex in two alternation tasks using different environments. *Brain Cogn.* 2002; 48(2-3):432-6.
- 60) Lepicard EM, Venault P, Negroni J, Perez-Diaz F, Joubert C, Nosten-Bertrand M, Berthoz A and Chapouthier G. Posture and balance responses to a sensory challenge are related to anxiety in mice. *Psychiatry Res.* 2003; 118(3):273-84.
- 61) Levine S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox Res.* 2002; 4(5-6): 557-564.

- 62) Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92(2):180–5.
- 63) Lister RG. Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.* 1990; 46:321–340.
- 64) Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD and Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci.* 2000; 3(8):799-806.
- 65) Liu D, Diorio J, Tannenaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM and Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors and hypothalamo-pituitary-adrenal response to stress. *Science* 1997; 277:1659–1662.
- 66) Lordi B, Protais P, Mellier D and Caston J. Acute stress in pregnant rats: effects on growth rate, learning, and memory capabilities of the offspring. *Physiol. Behav.* 1997; 62(5): 1087-92.
- 67) Lordi B, Patin V, Protais P, Mellier D and Caston J. Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int J Psychophysiol.* 2000; 37(2): 195-205.
- 68) Luine V, Villegas M, Martinez C and McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res.* 1994; 639(1): 167-170.

- 69) Lupien SJ and McEwen BS. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev* 1997; 24(1): 1-27.
- 70) McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research* 2000; 886(1-2): 172-189.
- 71) McEwen BS and Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995; 5: 205-216.
- 72) Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1161–1192.
- 73) Metz GA, Schwab ME and Welzl H. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats. *Physiol Behav.* 2001; 72(1-2):29-35.
- 74) Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiol.* 2003; 70: 83-244.
- 75) Misslin R, Belzung C and Vogel E. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behav. Process.* 1989; 18:119–132.
- 76) Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 1955; 48:254–260.

- 77) Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F and Martin JR. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol.* 1995; 6(7): 682-687.
- 78) Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale.* 1997; 23(4):280-289.
- 79) Morris RG. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 1984; 11: 47-60.
- 80) Morris RG, Garrud P, Rawlins JN and O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297(5868): 681-683.
- 81) Morrow BA, Redmond AJ, Roth RH and Elsworth JD. The predator odor, TMT, display a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Research* 2000864 (1), 146-151.
- 82) Nair HP, Berndt JD, Barrett D and Gonzalez-Lima F. Maturation of extinction behavior in infant rats: large-scale regional interactions with medial prefrontal cortex, orbitofrontal cortex, and anterior cingulate cortex. *J. Neurosci.* 2001; 21(12): 4400-4407.
- 83) Navarro M, Rubio P and de Fonseca FR. Behavioural consequences of maternal exposure to natural cannabinoïds in rat. *Psychopharmacol.* 1995; 122(1): 1-14.

- 84) Nelson RJ. An introduction to behavioral endocrinology. Massachusetts, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc. (2000).
- 85) Neumann ID, Wigger A, Liebsch G, Holboer F and Landgraf R. Increased basal activity of Hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuroendocrinol.* 1998; 23(5): 449-463.
- 86) Neumann PE and Collins RL. Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(12):5408-12.
- 87) Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A and Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programmes rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101 2174–2181
- 88) Ossenkopp KP, Sorenson L and Mazmanian D S. Factor analysis of open-field behavior in the rat (*Rattus norvegicus*) : application of the three-way PARAFAC model to a longitudinal data set. *Behav.* 1994; *Proc.* 31, 129–144.
- 89) Palma BD, Suchecki D and Tufik S. Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain Research* 2000; 861, 97-104.

- 90) Pardon MC, Perez-Diaz F, Joubert C and Cohen-Salmon C. Influence of a chronic ultramild stress procedure on decision-making in mice. *J Psychiatry Neurosci.* 2000; 25(2):167-177.
- 91) Patin V, Vincent B, Lordi B and Caston J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups ? *Dev. Brain Res.* 2004; 149(2): 85-92.
- 92) Peeler DF and Nowakowsky RS. Genetic factors and the measurement of exploratory activity. *Behav. Neural Biol.* 1987; 48:90–103.
- 93) Pellow S, Chopin P, File SE, and Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14(3):149–67.
- 94) Purdy LP, and Metzger BE.. Influences of intrauterine metabolic environment on adult disease: what may we infer from size at birth? *Diabetologia* 1996; 39:1126–1130.
- 95) Rabat A, Bouyer JJ, Aran JM, Le Moal M and Mayo W. Chronic exposure to an environmental noise permanently disturbs sleep in rats: inter-individual vulnerability. *Brain Res.* 2005; 1059(1):72-82.
- 96) Racca S, Spaccamiglio A, Esculapio P, Abbadessa G, Cangemi L, Dicarlo F and Portaleone P. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81(4): 894-900.

- 97) Ramos A and Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998; 22(1):33-57.
- 98) Relier JP. Influence of maternal stress on fetal behavior and brain development. *Biol Neonate* 2001; 79: 168-171.
- 99) Rodgers RJ and Johnson NJT. Factor analysis of spatio-temporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52(2):297-303.
- 100) Rodgers RJ and Cole JC. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol Behav* 1993; 54:729-736.
- 101) Rodgers RJ and Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997; 21(6):801-10.
- 102) Rudrauf D, Venault P, Cohen-Salmon C, Berthoz A, Jouvent R and Chapouthier G. A new method for the assessment of spatial orientation and spatial anxiety in mice. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004; 13(3):159-65.
- 103) Russell JA and Brunton PJ. Neuroactive steroids attenuate oxytocin stress responses in late pregnancy. *Neuroscience.* 2005. In press.
- 104) Sandi C. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. 1998; *Neural Plast.* 6: 41-52

- 105) Seckl JR. Physiologic programming of the fetus. Clin. Perinatal. 1998; 25: 939-964.
- 106) Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long term programming. Eur J Endocrinol 2004; 151: U49-62.
- 107) Selye H. Le stress de la vie. New York, Toronto, Londres, McGraw-Hill Book Company (1956).
- 108) Sharp PE and LaRegina MC. The laboratory rat. 1998; CRC Press.
- 109) Shors TJ, Weiss C and Thompson RF. Stress-induced facilitation of classical conditioning. Science. 1992; 257(5069): 537-539.
- 110) Speirs H, JR Seckl and R Brown. Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. J. Endocrinol. 2004; 181: 105-116.
- 111) Spielberger CD. (1966). Theory and research on anxiety. Dans Spielberger CD. (Ed.), Anxiety and behavior (pp. 3-20). New York: Academic Press.
- 112) Sun K, Yang K and Challis JRG. Differential expression of 11beta-hydroxysteroid deshydrogenase type 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. J. Clin. Endocrinol. Metabolism 1997; 82: 300-305.
- 113) Tanaka M. Emotional stress and characteristics of brain noradrenaline release in the rat. Ind Health 1999; 37 (2):143-156.

- 114) Thullier F, Hayzoun K, Dubois M, Lestienne F and Lalonde R. Exploration and motor activity in juvenile and adult rats exposed to hypergravity at 1.8 G during development: a preliminary report. *Physiol Behav.* 2002; 76(4-5):617-22.
- 115) Torras-Garcia M, Costa-Miserachs D, Coll-Andreu M and Portell-Cortes I. Decreased anxiety levels related to aging. *Exp Brain Res.* 2005; 164(2):177-84.
- 116) Trullas R and Skolnick P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology* 1993; 111:323–331.
- 117) Van de Berg WD, Kwajtaal M, de Louw AJ, Lissone NP, Schmitz C, Faull RL, Blokland A, Blanco CE and Steinbusch HW. Impact of perinatal asphyxia on the GABAergic and locomotor system. *Neuroscience* 2003; 117(1):83-96.
- 118) Van de Berg WD, Blokland A, Cuello AC, Schmitz C, Vreuls W, Steinbusch HW and Blanco CE. Perinatal asphyxia results in changes in presynaptic bouton number in striatum and cerebral cortex-a stereological and behavioral analysis. *J Chem Neuroanat.* 2000; 20(1): 71-82.
- 119) Verin M, Partiot A, Pilon B, Malapani C, Agid Y and Dubois B. Delayed response tasks and prefrontal lesions in man. Evidence for self generated patterns of behaviour with poor environmental modulation, *Neuropsychologia* 1996; 31:1279–1296.

- 120) Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS and Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 2002; 22(15): 6810-8.
- 121) Walker CD, Deschamps S, Proulx K, Tu M, Salzman C, Woodside B, Lupien S, Gallo-Payet N and Richard D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29(5): 364-382.
- 122) Wall PM and Messier C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001; 25(3) :275-86.
- 123) Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M and Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neurosci.* 2004; 7(8): 847-854.
- 124) Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun.* 2005;19(4): 296-308.
- 125) Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. *Prog Neurobiol.* 2001; 65:427–51.
- 126) Welberg LAM and Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol.* 2001; 13:113–28.

- 127) Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 1997; 134(4): 319-329.
- 128) Witschi E. Development of vertebrates. 1956; Saunders, Philadelphia.
- 129) Zhang ZW. Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: intrinsic properties and synaptic function. *J. Neurophysiol.* 2004; 91(3): 1171-1182.

